

**SÄULEN-GELCHROMATOGRAPHIE UND
ELEKTROPHORESE MENSCHLICHER
HERZMUSKELPROTEINE MIT
MOLEKULARGEWICHTSSCHÄTZUNGEN**

Gerhard Meister

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553809_0037

DISSERTATIONS— UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. SEITZ

SÄULEN-GELCHROMATOGRAPHIE UND ELEKTROPHORESE MENSCH-
LICHER HERZMUSKELPROTEINE MIT MOLEKULARGEWICHTS-
SCHÄTZUNGEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerhard Meister

aus
München

1973

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Nowy
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Seitz
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.3.1973



INHALTSVERZEICHNIS:

	Seite
EINLEITUNG:	1
METHODIK:	6
I) Gewinnung des Myokardextraktes	6
II) Säulen-Gelchromatographie	8
III) Membranelektrophorese	12
ERGEBNISSE:	16
I) Chromatographie des Gesamtexttraktes	16
II) Elektrophorese menschlicher Myokardextrakte	16
III) Vergleichende Elektrophorese der Extrakte von Mensch und Kalb	18
IV) Vergleichende Elektrophorese mit Humanserum	21
V) Zweidimensionale Darstellung der Proteine	23
VI) Molekulargewichtsschätzungen	26
DISKUSSION:	29
I) Diskussion der Methodik	29
II) Diskussion der Ergebnisse	35
ZUSAMMENFASSUNG:	41
LITERATURVERZEICHNIS:	42

EINLEITUNG:

Die ersten Untersuchungen von Sarkoplasmaeiweiß, wie sie von Fürth (33) bereits 1895 an einem von ihm gewonnenen Muskelpressaft anstellte, ergaben, daß das Sarkoplasma nur Proteine mit Albumineigenschaften enthielte. Fürth prägte für sie den Ausdruck Myogen, der z. T. heute noch in Gebrauch ist. Später zeigten Weber und Meyer (88), daß ein Teil der Sarkoplasmaproteine bei der Dialyse ausfiel, also Globulineigenschaften besaß, und nannten diese Fraktion Globulin X. Schließlich gelang es Baranowsky (6) Myogen A zu kristallisieren, dem darauf Aldolaseaktivität nachgewiesen werden konnte. Heute weiß man, daß die Proteine des Sarkoplasmas größtenteils Enzymproteine darstellen, von denen ein erheblicher Teil durch Bücher u. Mitarb. (12) mittels Ammoniumsulfatfraktionierung isoliert und identifiziert werden konnte.

Nach der Entwicklung der Elektrophorese von Tiselius (84) stand ein weiterer Weg offen, Muskeleiweiß zu analysieren und zu charakterisieren. Jakob (42) und Dubuisson (28) waren unter den ersten die diesen Weg beschritten und durch Elektrophorese wässriger Extrakte aus Skelettmuskulatur bis zu 8 Proteine verschiedener Mobilität nachwiesen, die sie in drei Hauptgruppen einteilen konnten: das am weitesten anodisch wandernde Myoalbumin, das langsam wandernde Myogen, und das Myosin, neben Globulin X, Myoglobin und weiteren Fraktionen. Bestätigt wurden diese Ergebnisse u. a. von Disteche (25, 26, 27), dem es gelang, eine ganze Reihe von Proteinen aus der Myogengruppe rein darzustellen und zu kristallisieren. Bosch (11) konnte Myogenfraktionen, die durch Extraktion aus Muskelhomogenaten mit Phosphatlösungen niedriger Ionenstärke gewonnen wurden, in 8 elektrophoretische Gipfel aufspalten. Jughes (39) untersuchte verschiedene menschliche Muskelproteine mittels Stärkegel-Elektrophorese und fand 12 Komponenten, von denen 9 anodisch und 3 kathodisch liefen. Vergleichende Elektrophoresen von Herz- und Skelettmuskelproteinen, wie sie von Cruck (17) und später von Nowy u. Mitarb. (65) durchgeführt wurden, zeigten bedeutende qualitative und quantitative Differenzen zwischen beiden Muskeltypen.

Nowy (65, 67), der sich eingehend mit der Proteinzusammensetzung des Myokards beschäftigte, fand 7 bis 10 Fraktionen, deren elektrophoretisches Muster sich als spezieverschieden erwies und sogar innerhalb eines Organs (Atrium, Ventrikel, usw.) deutliche quantitative Unterschiede bot.

Zahlreiche Forschungen der letzten Jahre, die sich hauptsächlich der Frage nach dem Aufbau des Skelettmuskels, aber auch der Herzmuskulatur, widmeten, führten schließlich weitgehend zur Aufklärung der Funktion des kontraktiven Apparates, der intrazellulären Stoffwechselmechanismen und der Interaktion von Kern, Organellen und Cytoplasma. Eine zentrale Stellung nahm dabei die Erforschung der Enzymproteine ein. Die Weiterentwicklung der von Svedberg (83) eingeführten Ultrazentrifuge ermöglichte aus Gewebshomogenaten eine weitgehende Fraktionierung von Zellbestandteilen wie Kerne, Myofibrillen, Mitochondrien und Überstand (= lösliches Cytoplasma), von denen jeder für sich auf seinen Gehalt an Enzymen untersucht werden konnte. Verbesserte Methoden der von Smithies (81) entwickelten Stärkegelelektrophorese, aber auch der Elektrophorese auf Celluloseacetat nach Kohn (49) und der neuerdings öfter angewandten Polyacrylamidgelelektrophorese nach Raymond und Weintraub (72), in Kombination mit spezifischen Nachweisverfahren, führten schnell zur Entdeckung einer ganzen Reihe von Isoenzymen. Aus dem Sarkoplasma von Skelett- und Herzmuskel verschiedener Tierarten aber auch des Menschen wurden vor allem Enzyme der Glykolyse und des Pentosephosphatzyklus, die sich, wie Johnson (43) feststellte, fast ausschließlich im Cytoplasma befinden, sowie eine große Zahl anderer Fermente, elektrophoretisch untersucht.

Wieme (89), der die elektrophoretische Heterogenität der Lactatdehydrogenase (LDH) aus Serum und verschiedenen Organen der Ratte und weißen Maus nachwies, fand 5 LDH-Isoenzyme, die alle im Myokard enthalten waren, von denen jedoch quantitativ die am weitesten anodisch wandernden Fraktionen I und II stark überwogen. Vergleiche mit Serumproteinen, die wie sich herausstellte stets alle 5 LDH-Fraktionen enthalten, ergaben nach Wieme (90), Blankaer (8), Richterich u. Mitarb. (73) u. a., daß LDH I mit den α_1 -, II mit den α_2 -, III mit den β - und IV, V mit den gamma-Globulinen

des Serums wanderten. Ebenfalls 5 LDH-Isoenzyme wurden in menschlichen Herzmuskelextrakten durch Wachsmuth und Pfeleiderer (87), Scheifarth u. Mitarb. (78), Richterich u. Mitarb. (73) übereinstimmend gefunden. Zwar scheiterte der Versuch von Nisselbaum und Badansky (63) die als herzmuskelspezifisch angenommene Herz-LDH immunologisch von anderer Gewebs-LDH zu unterscheiden; trotzdem konnte nach Richterich (73) u. a. nachgewiesen werden, daß Gewebe mit hohem O_2 -Verbrauch wie Herz, Hirn, Niere vorwiegend schnell wandernde Komponenten (I, II), Skelettmuskel und Leber hingegen hauptsächlich langsame Fraktionen (IV, V) beinhalten, und fast jedes Organ eine charakteristische Verteilung zeigt. Wie Kleine (48) demonstrieren konnte, besitzen LDH und Aldolase, vor allem aber Kreatinphosphokinase (CPK) mit 86 - 98%, ihre höchste Aktivität im Cytoplasma des Muskels. Elektrophoretische Untersuchungen über die Heterogenität der CPK aus verschiedenen Organen einiger Tiere, im Vergleich mit dem Menschen, wie sie u. a. Burger u. Mitarb. (13) durchführten, erbrachten immer wieder die Bestätigung der Existenz dreier Isoenzyme. Nach Kar und Pearson (45) zeigte die Agarelektrophorese menschlicher Herz- und Skelettmuskelextrakte alle 3 CPK-Fraktionen. Trainer u. Gruenig (86) und Rosalki (76) führten die Trennung der CPK auf Celluloseacetatfolien durch und fanden übereinstimmend, daß menschliches Myokard die Komponenten II und III enthielt, während im Skelettmuskel vorwiegend oder ausschließlich Fraktion III, im Gehirn und anderen Organen ausschließlich CPK I nachzuweisen waren. Trainer u. Gruenig lokalisierten CPK I entsprechend ihrer Mobilität in den Bereich des Albumins, II in die β -Globulin- und III in die gamma-Globulingegend. Eine dimere Struktur der CPK, welche die 3 Kombinationen MM (Muscle), BB (Brain), MB (Hybrid) zuläßt, wurde von Graig und Smith (36) und Dawson u. Mitarb. (19) angenommen. Von den Transaminasen sei hier nur die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) besonders erwähnt: An wässrigen Extrakten aus Schweineherz gelang es Borst und Peeters (10), eine strukturgebundene und eine freie GOT zu differenzieren, die von Morino u. Mitarb. (62) als mitochondriale und cytoplasmatische GOT identifiziert, kristallisiert und immunchemisch unter-

schieden werden konnte. Die Elektrophorese des Überstandes von Rinderherzhomogenaten auf Celluloseacetat durch Romel und LaMancusa (75) erbrachte eine Fraktion im Bereich der gamma-Globuline und eine im Bereich zwischen α_2 - und β -Globulinen. Decker und Rau (20) fanden hingegen mittels Stärkeelektrophorese menschlicher und tierischer Herzmuskelextrakte ein kathodisches und 3 anodische Isoenzyme. Das erste Enzym, das in Muskelextrakten nachgewiesen wurde, war Aldolase (Ald.). Obgleich nach Kronmann u. Mitarb. (52) 15% des Skelettmuskelmyogens aus Ald. bestehen, ist der Gehalt an Ald. im Herzmuskel weniger als halb so groß, wie Kleine (47) feststellte. Rutter u. Mitarb. (77) unterschieden hinsichtlich ihrer physicochemischen und enzymatischen Eigenschaften Muskelaldolase A und Leberaldolase B_1 und B_2 . Bei elektrophoretischen Untersuchungen über die Heterogenität der Ald. in Rattenorganextrakten konnten Christen u. Mitarb. (14) 9 Banden identifizieren, die je nach Organ eine charakteristische Verteilung zeigten. Grundlegende Unterschiede der Ald.-Isoenzymmuster menschlicher Organe fand Dikow (23), der 14 FDP-abhängige Ald. nachweisen konnte, von denen der Herzmuskel 8 aufwies. Von zahlreichen weiteren Studien über Isoenzyme, beispielsweise der Malatdehydrogenase, der Isocitratdehydrogenase (Katz und Kalow (46)), der Pyruvatkinase (Fellenberg u. Mitarb. (30)) und anderer Fermente des Herzmuskels und anderer Organe, wurde in der jüngeren Literatur berichtet.

Gerade im Hinblick auf die diagnostische Bedeutung der Isoenzyme, auf die mehrere oben genannte Autoren hinweisen, hat sich die Erforschung der Herzmuskelproteine in den letzten Jahren mehr und mehr der spezifischen Darstellung von Enzymen gewidmet. So wird zwar über die Enzymelektrophorese speziell menschlicher Myokardproteine einiges berichtet, doch ist über das Gesamtmuster löslicher Proteine des menschlichen Herzens selbst, ihre qualitative und quantitative Verteilung, sowie über ihre Molekulargewichte nur wenig bekannt.

Auf Nowys Ergebnissen und Erfahrungen aufbauend soll in vorliegender Arbeit neben der horizontalen Zonenelektrophores wasserlöslicher, nicht-kontraktiler, menschlicher Myokardproteine ein weiterer Schritt zur Cha-

akterisierung dieser Proteine hinsichtlich ihrer Molekulargewichte getan werden. Durch Kombination von Gelfiltration und Elektrophorese soll eine zweidimensionale Darstellung der Herzmuskelproteine erreicht, und Molekulargewichtsschätzungen vorgenommen werden.

METHODIK:

1) Gewinnung des Myokardextraktes

1) Herkunft des Ausgangsmaterials:

Zur Herstellung eines Herzmuskelextraktes verwendeten wir zwei geeignete Menschenherzen. Mit dem Ziel möglichst allgemein gültige Aussagen über Herzmuskelproteine machen zu können, mußten wir bedacht sein, nur gesunde Organe, die keinerlei pathologische Veränderungen zeigten, aufzuarbeiten. Postmortale Autolyse und bakterielle Zersetzung waren möglichst gering zu halten oder zu vermeiden. Um senile Organatrophie auszuschließen, sollten die Donatoren bis zu ihrem Ableben eine gewisse Altersgrenze nicht überschritten haben. Es war sicherzustellen, daß Krankheiten, speziell Herzmuskelerkrankungen und gewebserstörende Prozesse, sowie Vergiftungen, Starkstromschäden u. a., als Todesursachen nicht in Frage kamen. Der Zeitpunkt zwischen Todeseintritt und Sektion sollte möglichst kurz gehalten werden.

Als Organdonatoren eigneten sich deshalb insbesondere jene bedauernswerte Personen, die durch äußere Gewalteinwirkung ad exitum gekommen waren. Das gerichtsmedizinische Institut der Universität stellte uns freundlicherweise zwei Organe zur Verfügung, die den eben genannten Bedingungen genügten. Da wir die beiden Menschenherzen getrennt voneinander verarbeiteten, erhielten wir zwei verschiedene Extrakte, die wir im folgenden zur Unterscheidung mit M1 und M2 bezeichnen. An dieser Stelle seien auch die zugehörigen Daten aufgeführt:

zu M1:

männlich, 25a., am 6.9.70, 21.30 Uhr Tod durch Messerstich in li. Atrium, Herzbeutelamponade; 23.30 Uhr Einlieferung in Kühlraum des gerichtl.med. Instituts, Lagerung bei 3°C bis 7.9.70; 14.00 Uhr Sektion, sofortige Entnahme des Herzens und Lagerung im Tiefkühlraum bei -30°C.

zu M2:

weiblich, 26a., nachts vom 26.11. auf 27.11.70 Tod durch Halsschnitt und zahlreiche Messerstiche, Verbluten; 27.11. 6.00 Uhr Einlieferung in Kühl-

raum des gerichtl.med.Instituts, Lagerung bei 3°C bis 8.00 Uhr Sektion, sofortige Entnahme des Herzens und Lagerung im Tiefkühlraum bei -30°C .

Bereits Stunden nach der Sektion wurden die Organe abgeholt und bis zur Verarbeitung in Trockeneis eingebettet. Die Methoden zur Vorbereitung und weiteren Aufarbeitung des Ausgangsmaterials sind für M1 und M2 im wesentlichen identisch und gehen auf Techniken zurück, die Nowy (68) bereits zur Herstellung von Kalbsherzextrakten mit Erfolg anwendete.

2) Aufbereitung der Organe:

Das Herz wurde im Kühlschrank aufgetaut und zunächst mit auf 0°C gekühlter, physiologischer Kochsalzlösung gründlich gewaschen. Anschließend durchspülten wir die Koronargefäße mit derselben Lösung unter einem Druck von 150 cm Wassersäule solange, bis im venösen Schenkel klare Flüssigkeit erschien. Dabei gingen wir mit einem Schlauch, der mit einem höher stehenden Auslaufgefäß verbunden und mit einem passenden Endstück versehen war, in die Koronarostien ein. Wir arbeiteten stets auf eisgekühlter Unterlage, weil eine unerwünschte Erwärmung des Materials vermieden werden sollte. Nachdem Gefäßstamm, Bindegewebe und Fett abpräpariert worden waren, trennten wir Atrium und Ventrikel in der Ventilebene voneinander, wogen die Teile ein und zerkleinerten sie. Das Myokard wurde nun mit der doppelten Gewichtsmenge aqua bidestillata im Eisbad bei 0°C homogenisiert (Homogenisator E. Bühler, Tübingen, 7000 U/min).

3) Extraktion:

Zur Gewinnung eines Auszuges wurde das Homogenat 18 Std. im Eisschrank bei 2°C gerührt und anschließend bei 30.000 U/min und 0°C zweieinhalb Stunden ultrazentrifugiert (Beckmann Ultrazentrifuge L2, Rotor 30, mittlere Beschleunigung: 78.500 g). Als Überstand ergab sich ein klarer, rotbrauner Extrakt; das Sediment wurde verworfen. Der nach der Biuretmethode bestimmte Gesamteiweißgehalt des Ventrikelextraktes betrug ca. 1g/100 ml.

4) Ultrafiltration:

Es galt nun auf der einen Seite die Eiweißkonzentration des Extraktes zu er-

höhen, zum anderen den Gehalt an niedermolekularen Substanzen und Peptiden zu verringern. Hierfür erschien uns die Ultrafiltration als geeignete Methode. Die von uns verwendeten Ultrafilter (6390-1, LKB-Produkte AB, Stockholm) wurden mit größter Sorgfalt auf entsprechende Filterkörbe aufgezogen in den eiswassergekühlten Extrakt getaucht und zur Beschleunigung der Dialyse an das Vakuum einer Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Auf diese Weise brachten wir das Konzentrat innerhalb von 10 Stunden auf einen Eiweißgehalt von 3 - 4 g/100 ml. Aus der fleischfarbenen Tönung des Dialysates war zu erkennen, daß ein geringer Teil des Myoglobins und Proteine dieser Größenordnung die Membranschranke passiert hatten. (Ausschlußgrenze bei Mol.Gew. ca. 30.000). Das Ultrafiltrat wurde für andere Zwecke gefriergetrocknet, das Proteinkonzentrat in Portionen bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

II) Säulen-Gelchromatographie

Ein auch als Gelfiltration bezeichnetes chromatographisches Trennverfahren diente uns zur weiteren Aufschlüsselung der Herzmuskelproteine. Als Standardmethode in Forschungs- und Industrielaboratorien hat sich die Gelfiltration mit Sephadex durch ihre vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten weiten Raum verschafft. Das stark hydrophile Gel, ein modifiziertes Polysaccharid in Perlenform, das nach seinem Quellgrad in Wasser typisiert wird, eignet sich besonders dazu, Substanzen nach ihrer Molekülgröße zu trennen. Das System besteht aus einer stationären Phase, die durch die Gelsäule dargestellt wird, und einer mobilen Phase, dem Elutionsmittel, das die Säule unter konstantem Druck in einer Richtung durchspült. Bestandteile einer im Elutionsmittel gelösten Probe treten abhängig von der Größe und Form ihrer Moleküle in unterschiedlichem Maße in die Gelpartikel ein, werden daher verschieden stark retentiert und verlassen somit getrennt die Säule. Moleküle, die größer als die Poren im Sephadex-Gel sind, die also oberhalb seiner Ausschlußgrenze liegen, dringen nicht in das Gel ein und werden deshalb zuerst eluiert, während kleine Moleküle, die in ihrer Teilchengröße unterhalb des Fraktionierungsbereichs liegen, die Säule zuletzt ver-

lassen. Ihre Elutionsvolumina stellen wichtige Bezugsgrößen dar und entsprechen im ersten Fall dem sogenannten äußeren Säulenvolumen V_o , im zweiten Fall etwa dem Gesamtvolumen der Säulenfüllung V_t . Ausgedehnte Untersuchungen zeigen, daß die Elutionsvolumina globulärer Proteine, aber auch diverser anderer Verbindungsklassen, weitgehend von ihrem Molekulargewicht abhängen. Über einen weiten Bereich ist ihr Elutionsvolumen V_e eine nahezu lineare Funktion des logarithmisch aufgetragenen Molekulargewichts. Diese Eigenschaft kann man nach Herstellung einer Eichkurve zu Molekulargewichtsbestimmungen nutzen (Determann (22)). Das Elutionsverhalten eines Stoffes hängt, abgesehen von der Wahl des Elutionsmittels und der Art des Gels, erheblich von den Abmessungen der Säule und der Packungsdichte ihrer Füllung ab. Es hat sich daher die Einführung einiger Parameter bewährt, die von den genannten Gegebenheiten weitgehend unabhängig sind:

Im allgemeinen läßt sich die Elution eines Stoffes einfach durch sein relatives Elutionsvolumen $V_e : V_o$ charakterisieren. Daneben werden auch die Werte $V_o : V_e$ und $V_e : V_t$ verwendet, die allerdings wie auch $V_e : V_o$ mit der Packungsdichte des Gels und dem Arbeitsdruck geringfügig schwanken. Der bisher in der Gelfiltration meistgebrauchte Parameter $K_{av} = (V_e - V_o) : (V_t - V_o)$ ist auch von der Packungsdichte und der Säulenfüllung unabhängig und wurde von Laurent und Killander (55) aus der Grundgleichung der Verteilungschromatographie hergeleitet.

1) Technische Durchführung:

Zur Durchführung unserer Versuche diente uns eine ca. 1 m lange Chromatographiesäule mit Wasserkühlung, die einen Innendurchmesser von 32 mm besaß (Säule LKB 4900, Colora Tauchkühler TK 64, Colora Umlaufpumpe mit Regelheizung). Die Säulenfüllung bestand aus Sephadex Gel 200 (Pharmacia Uppsala, Schweden), dessen Fraktionierungsbereich sich über Molekulargewichte von 5000 bis 800.000 erstreckt. Die Elution erfolgte mit verdünnten Tris-EDTA-Borsäure-Puffer, pH 8,9, bei einer Temperatur von 2°C.

Zusammensetzung des Puffers:	Tris	605,0 g
	EDTA	60,0 g
	Borsäure	46,0 g
	+ aqua dest. ad	10 l

(Verdünnung: 1 + 2,5 Teile aqua dest.)

Der Puffer mußte vor Gebrauch gründlich evakuiert werden. Um Säulendurchfluß und Arbeitsdruck konstant zu halten, verwendeten wir als Elutionsmittelreservoir eine Mariotte'sche Flasche, die sich beliebig auf die gewünschte hydrostatische Niveaudifferenz zwischen Pufferspiegel und Säulenauslauf einstellen läßt. Mit einem Arbeitsdruck von 13 cm H₂O und einer Flußrate von 3,2 ml/cm² x h lagen wir, wie aus Erfahrungswerten hervorging, in einem Bereich optimaler Bedingungen. Das Eluat leiteten wir durch ein UV-Absorptiometer, Wellenlänge 253,7 nm, (Uvicord, LKB 3400 A) einem Fraktionssammler (Radi Rac, LKB 3400 B) zu, der halbstündlich die Fraktion wechselte. Dabei wurden die Konzentrationsänderungen über einen synchron laufenden Fallbügelschreiber (LKB 6520 A) registriert.

2) Vorbereitungen zur Säulenchromatographie:

Sephadex G 200, das eine Wasseraufnahme von 20 ml/g Trockensubstanz besitzt, muß, bevor es zur Gelfiltration verwendet werden kann, mindestens drei Tage bei Raumtemperatur oder fünf Stunden im siedenden Wasserbad quellen. Richtiges Packen der Säulenfüllung ist ausschlaggebend für die Trennleistung. Um die Entstehung von Luftblasen zu vermeiden, die zu ungleichmäßigem Durchfluß führen, ist das reichlich mit Puffer aufgerührte Gel vor dem Einfüllen zu evakuieren. Hat man den Säulenauslauf bis über das geltragende Perlonsieb blasenfrei mit Puffer gefüllt, so gießt man die Gelsuspension langsam an einem Glasstab in das Rohr ein oder benützt bei größeren Säulen einen Einfüllschlauch. Schließlich wird die Füllung dadurch stabilisiert, daß man sie nach Absetzen des Gels mit dem dreifachen Säulenvolumen an Puffer unter Arbeitsdruck durchspült. Die auf diese Weise vorbereitete Säule kann nun für eine praktisch unbegrenzte Zahl von Trennun-

gen benützt werden, wobei es sich empfiehlt, das Sephadex bei längerer Lagerung etwa mit 0,02% NaN_2 (Natriumacid) gegen mikrobielles Wachstum zu schützen.

3) Probenauftrag:

Für den von uns verwendeten Gelytp wird empfohlen, den über der Geloberfläche ruhenden Pufferüberstand zu belassen und die Probelösung mit einer Pipette oder Spritze langsamst zu unterschichten, ohne die ebene Geloberfläche aufzuwirbeln. Falls die Dichte der Probelösung nicht ausreicht, kann sie durch Zusatz eines inerten, niedermolekularen Stoffes (wie z.B. Glucose) erhöht werden. Im Idealfall sollte das Probevolumen so klein gewählt werden, daß eben noch eine Verteilung über den gesamten Gelquerschnitt erzielt werden kann, weil dadurch die unvermeidbare Zonenspreizung weniger ins Gewicht fällt.

Da die Einzelfractionen aus der Chromatographie über die Elektrophorese einem weiteren Trennverfahren unterworfen wurden, waren zu unseren Untersuchungen größere Probemengen erforderlich. Wir trugen deshalb im ersten Versuch 3 ml des doppelt konzentrierten M1 - Extraktes, im zweiten Versuch 2 ml des fünffach konzentrierten M2 - Extraktes auf, um genügend Mengen Protein zur Weiterverarbeitung zu erhalten.

4) Einengung der Fractionen:

Die ersten Fractionen, die den höhermolekularen, temperaturempfindlichen Anteil an Proteinen beinhalteten, wurden zu ihrer Schonung sofort, alle weiteren Fractionen in kurzen Abständen, nach ihrer Elution dem Fraktions-sammler entnommen und, nachdem ihre Volumina gemessen worden waren, im Eisschrank nahe 0°C kühl gestellt. Die bis über das 100-fache verdünnten Fractionen mußten zur elektrophoretischen Auftrennung wieder auf einen Eiweißgehalt in der Größenordnung von 1 g/100 ml gebracht werden. Wir führten die Konzentrierung in zwei Stufen mit Carbowax (Polyäthylenglycol Type 40.000, Serva Heidelberg) in Dialysierschläuchen (Union Carbide Corporation, Chicago) durch. Die Einengung, die ebenfalls im Kühlschrank erfolgte, wurde beschleunigt, indem wir die etwa 12 ml messende Fraction

zuerst mittels eines größeren, dünnwandigen Dialysierschlauches innerhalb weniger Stunden auf ca. 1 ml brachten, und anschließend diese Menge in spitzen Zentrifugengläsern mit kleinen Dialysierschläuchen bis auf einen Tropfen von ca. 100 Mikroliter konzentrierten. Nach diesem Arbeitsvorgang schloß sich unmittelbar die Elektrophorese der einzelnen Fraktionen, welche bis zur Verwendung weiterhin kühl gelagert wurden, an.

5) Eichung der Säule:

Zu Molekulargewichtsbestimmungen der Myokardproteine mit Hilfe der Gelfiltration wurde die von uns verwendete Säule vor und nach jedem Versuch unter identischen Bedingungen geeicht. Als Eichproteine dienten uns:

(Molekulargew.)

Cytochrom c	13.000	
Myoglobin v. Pferd	17.800	(Serva Entwicklungslabor
Chymotrypsinogen	25.000	Heidelberg
Ovalbumin	45.000	und
Humanalbumin	67.000	Boehringer, Calibration
Aldolase	147.000	Kit 15967 KEAB)
IgG-Globulin	160.000	

Wir gaben zu einer Eichung nie mehr als drei bis vier Proteine in die Säule und wählten sie entsprechend ihrem Molekulargewicht so aus, daß sich die erhaltenen Elutionsgipfel nicht überschneiden. Als Elutionsvolumen V_e eines Proteins wurde das unter seinem Maximum im Elutionsdiagramm gemessene Volumen betrachtet. V_o wurde mit Dextranblau (Molekulargew.: 2.000.000) bestimmt, V_t durch einfaches Ausmessen der Säule. Aus den zur Verfügung stehenden Parametern ließen sich die erwähnten Beziehungen von $V_e : V_o$ und K_{av} zum Molekulargewicht in Eichkurven darstellen.

III) Membranelektrophorese

Die Elektrophorese, die die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit gelöster Proteine im elektrischen Feld zu deren Trennung nutzt, ermöglichte uns eine weitere Differenzierung der Herzmuskelproteine nach ihrer

elektrophoretischen Mobilität. Diese hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, die hier nicht näher erläutert werden sollen. Entscheidenden Einfluß auf die Qualität der Trennung von Proteinen hat die zur Elektrophorese angewandte Methode. Es zeigte sich, daß bei der horizontalen Träger-Elektrophorese, die wir durchführen, je nach Wahl des Trägermediums und des Puffers enorm unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden. Für unsere Untersuchungen schien uns die Membranelektrophorese auf Acetatcellulosefolien nach Kohn (49) am geeignetsten. Sie ist der Papierelektrophorese an Trennschärfe, Fraktionsunterteilung, Laufzeit und kolorimetrischer Auswertbarkeit weit überlegen.

1) Technische Durchführung der Elektrophorese:

Von jeder einzelnen aus der Chromatographie stammenden Fraktion stellten wir zwei Membranelektrophoresen her, von denen die eine elektropherographisch ausgewertet wurde. Die andere diente uns zur Identifikation der erhaltenen Komponenten und ihrem Vergleich mit dem Gesamtextrakt, den wir deshalb jeweils über der halben Breite der Folie mitlaufen ließen. Wir führten die Elektrophoresen ausschließlich auf Membranfolien (112 00 / 40 x 230 mm) der Sartorius Membranfilter GmbH (Göttingen) durch, gebrauchten aber für Vergleiche von Serum- und Myokardproteinen untereinander das Format 140 x 230 mm. Mit dem von Aronsson und Grönwall (5) entwickelten Tris-EDTA-Borsäure-Puffer, pH 8,9, (Rezept siehe oben!) ließ sich bei einer Spannung von 200 Volt und einer Laufzeit von 8 Stunden eine optimale Auftrennung erreichen. Um die Vielzahl der anfallenden Fraktionen (ca. 45 pro Versuch) möglichst rasch aufzuarbeiten, hatten wir stets mehrere Elektrophoresekkammern, die mit je 6 Streifen belegt werden konnten, gleichzeitig in Betrieb (Elphor Kammern und Gleichstromspeisegerät von Bender & Hobein, München). Nach Beendigung der Elektrophoresen wurden die Membranen zur Sichtbarmachung der Komponenten 10 min lang in Amidoschwarz gefärbt und anschließend im Elphor Entfärbebad (9 Tl. Methanol, 1 Tl. Eisessig) herausdifferenziert. Danach wurden die vergleichenden Elektrophoresen auf Glasplatten aufgezogen und an der Luft

getrocknet, während die zum Pherogramm bestimmten Streifen noch transparent gemacht werden mußten. Hierzu wurden sie auf dünne Glastafeln aufgezogen, 5 min in Transparenzlösung (7 Tl. Dioxan, 3 Tl. Isobutanol) gebadet und darauf 10 min bei 105°C getrocknet.

2) Hinweise zur praktischen Ausführung der Elektrophoresen:

Der Erfolg der Membranelektrophorese beschriebener Art hängt nicht wenig von technischen Einzelheiten ab, die in der Anwendung berücksichtigt werden sollten:

- Die Kammer muß mittels Wasserwaage horizontal justiert sein.
- Um eine Heberwirkung auszuschließen, muß der Pufferspiegel in allen Räumen der Kammer gleich hoch stehen.
- Auf der trockenen Folie wird mit einem weichen Bleistift genau lotrecht zur Laufrichtung eine Startlinie markiert, ohne dabei die Membran zu verletzen.
- Man weicht die Folien in einer eigenen mit Pufferlösung gefüllten Wanne ein, indem man sie auf den Flüssigkeitsspiegel auflegt und erst dann untertaucht, wenn sie sich vollgesogen haben.
- Vor Gebrauch nimmt man die Membranen aus der Pufferlösung, trocknet sie zwischen zwei Filterpapieren rasch ab und beginnt unverzüglich mit dem Auftragen der Probe, da die Folien relativ schnell eintrocknen und damit unbrauchbar werden.
- Zum Probenauftrag können unterschiedliche Methoden angewendet werden. Wir benützten dazu Polyäthylen-Kapillaren (1 mm² Durchmesser), die zu einer haarfeinen Spitze ausgezogen waren, und strichen ca. 5 Mikroliter des Materials durch gleichmäßige Schwingbewegung unter sanftem, konstantem Druck auf der Startlinie aus.
- Hierbei muß zur Folienkante ein Mindestabstand von 0,5 cm eingehalten werden, um Randeffekte zu vermeiden.

3) Auswertung der Elektrophorese:

Die transparenten Elektrophoresefolien wurden mit einem Elphor-Integra-phen mit eingebautem Prozentrechner (Bender & Hobein, München) kolori-

metrisch ausgewertet. Das Gerät vermag die Extinktion über den einzelnen Zonen fortlaufend aufzuzeichnen und die Extinktionskurve in einem zweiten Schritt zu integrieren. Als Maximum einer Komponente, die kontinuierlich in einer Reihe von Fraktionen auftritt, wurde die Fraktion bestimmt, in der das Protein in der größten Menge vorhanden war. Dies war aus der großemäßigen Verteilung der Integrale über den einzelnen Komponenten ersichtlich. Die auf diese Weise erhaltenen Maxima sind mit den Elutionsmaxima der Proteine aus der Chromatographie identisch. Dadurch konnte das relative Elutionsvolumen jeder einzelnen Bande ermittelt, und Molekulargewichtsschätzungen vorgenommen werden.

ERGEBNISSE:

I) Chromatographie des Gesamtextraktes

Das Gelchromatogramm eines menschlichen Myokardextraktes aus Ventrikelmuskulatur zeigt vier deutlich abgrenzbare Gipfel, von denen der erste den außerhalb der Ausschlußgrenze des Gels laufenden makromolekularen Anteil darstellt (Ausschlußgrenze des Gels bei Molekulargew. 800.000). (Abb. 1) Der zweite Gipfel entspricht der 4,5 S - Fraktion des Humanserums mit einem Elutionsvolumen, das sich mit dem des Albumins deckt. Das dritte Maximum ist in der Hauptsache durch die Elution des Myoglobins bedingt, was die deutlich braune Farbe des Eluates annehmen läßt, während der letzte Gipfel nur niedermolekulare Bestandteile (Aminosäuren, Spaltprodukte, usw.) anzeigt. Daneben deuten sich noch zwei Maxima an, die durch die relativ starke Zonenspreizung des Chromatogramms überlagert werden. Die eine Erhebung liegt etwa im Bereich der 7 S-Fraktion des Serums, die andere folgt kurz nach dem Gipfel des Myoalbumins und zeigt in ihrem Eluat eine deutliche Rotfärbung, die zur Annahme berechtigt, daß es sich hierbei um Hämoglobin handeln könnte.

Natürlich darf die Beschreibung einzelner, ins Auge fallender Hauptfraktionen aus der Chromatographie nicht darüber hinwegtäuschen, daß es sich hier um eine Vielzahl von Proteinen unterschiedlicher Größe handelt, die im Chromatogramm integriert sind.

Vergleichen wir die aus beiden Menschenherzextrakten erhaltenen Chromatogramme, so erweisen sich diese als identisch.

II) Elektrophorese menschlicher Myokardextrakte

Die Elektrophorese der Herzmuskelextrakte zeigt eine größere Anzahl von einzelnen, zum Teil sich überlagernden Komponenten, von denen jedoch elf als besonders prägnant hervortreten. Zur Benennung der elektrophoretischen Banden scheint uns die von Dubuisson (28) vorgenommene Einteilung in drei Hauptgruppen, sowie die von einigen Autoren angewandte Zuordnung zu den Serumproteinen, mit denen keine physico-chemische Identität nach-

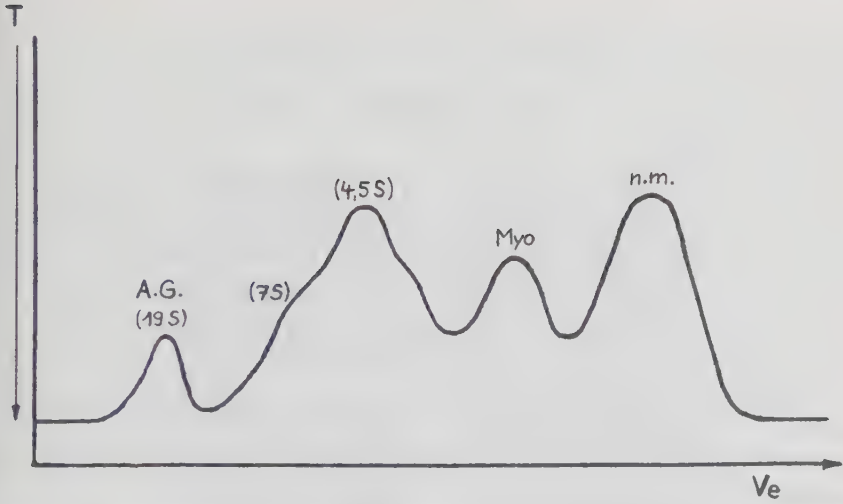


Abb. 1: Gelchromatogramm des Gesamtextraktes menschlicher Myokardmuskulatur

T = Transmission, V_e = Elutionsvolumen,

A.G. = Ausschlußgrenze des Gels, Myo = Myoglobin,

n.m. = niedermolekularer Anteil.

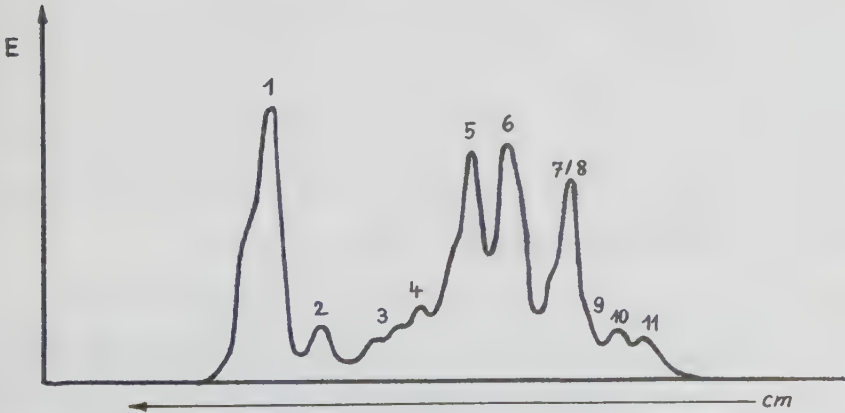


Abb. 2a: Pherogramm des Herzmuskelextraktes (M1)

E = Extinktion, 1 = Myoalbumin, 6 = Myoglobin

nachgewiesen ist, als unzureichend. Wir stützen uns deshalb auf die von Nowy (67, 68) und anderen Autoren verwendete Nomenklatur, nach der das am weitesten anodisch wandernde Myoalbumin als Komponente 1, und das bereits ungefärbt als rotbrauner Streifen sichtbare Myoglobin als Komponente 6 bezeichnet wird. Banden, die eine höhere Mobilität als Myoalbumin besitzen, werden Praemyoalbumine genannt. Vergleichende Elektrophoresen mit Kalbsherzextrakten, bei denen diese Nomenklatur bisher verwendet wurde, haben gezeigt, daß zwar die Komponenten 1 und 6 mit denen des Menschen übereinstimmen, die übrigen jedoch zum Teil erheblich differieren. Es dürfen also nicht alle von uns mit Zahlen bezeichneten Komponenten der Menschenherzextrakte mit den Komponenten anderer Spezies gleichgesetzt werden.

Abbildung 2a zeigt das Pherogramm des Extraktes M1 mit der von uns gewählten Bezeichnung der einzelnen Banden. Betrachtet man die Elektrophoresefolien mit bloßem Auge im Gegenlicht, so kann man weitaus mehr Zonen unterscheiden, als aus dem Elektropherogramm. So haben wir festgestellt, daß sich nahezu jede der 11 Banden in Untergruppen aufteilen läßt. Durch die zweidimensionale Aufschlüsselung der Proteine, auf die wir an anderer Stelle eingehen werden, kommen sogar noch weitere Subfraktionen ans Tageslicht. Vergleicht man die Elektrophoresen der Extrakte M1 und M2, so erscheint das Verteilungsmuster ihrer Banden kongruent, wie Abbildung 2b zeigt. Manche Komponenten sind jedoch mengenmäßig verschieden stark vertreten, so zum Beispiel 2c und 4c in M2 stärker als in M1 und Bande 3a umgekehrt in M1 stärker als in M2.

III) Vergleichende Elektrophorese der Extrakte von Mensch und Kalb

Wie schon erwähnt, zeigen die Komponenten 1 und 6 bei Mensch und Kalb die gleiche Mobilität. Es handelt sich hier um die Proteine Myoalbumin und Myoglobin. Ein Praemyoalbumin, das sich beim Kalb nach entsprechend weiter Auftrennung darstellt, wird von uns beim Menschen nicht gefunden, was jedoch seine Existenz nicht ausschließt. Wie Abbildung 2c zeigt, liegen auch die Banden 2, 3, 4 und 5 in etwa in der gleichen Höhe, während

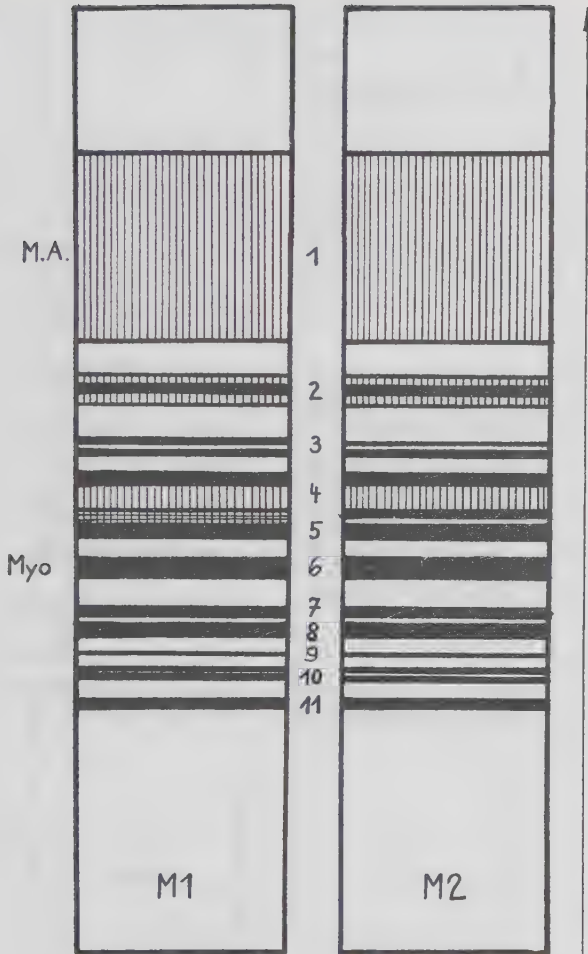


Abb. 2b: Vergleichende Elektrophorese der Extrakte M1 und M2
Halbschematische Darstellung in natürlicher Größe
M.A. = Myoalbumin, Myo = Myoglobin.

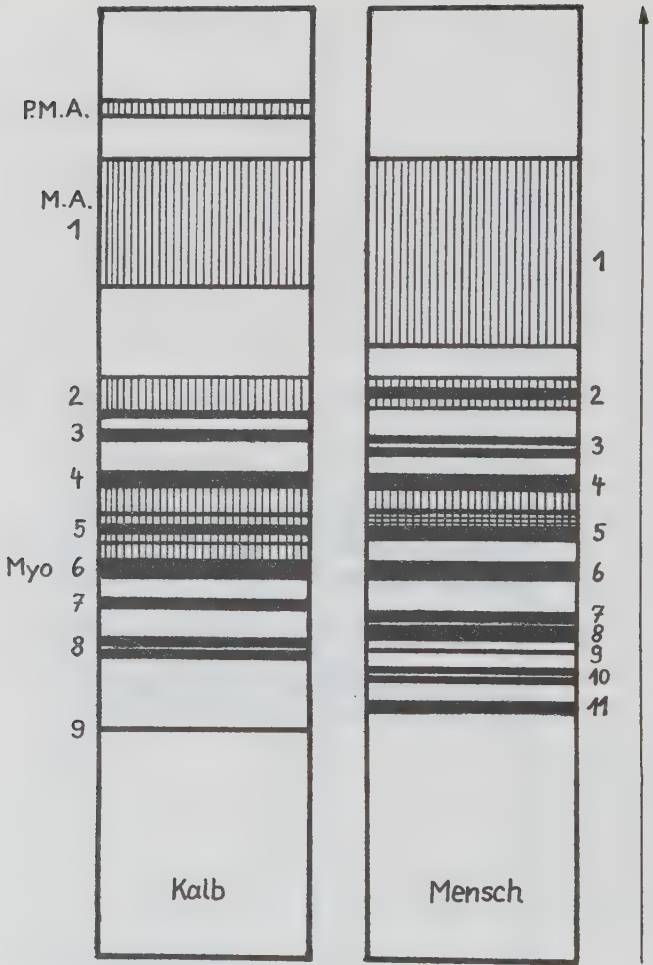


Abb. 2c: Vergleichende Elektrophorese der Extrakte von Mensch und Kalb

Halbschematische Darstellung in natürlicher Größe

P.M.A. = Prämyoalbumin, M.A. = Myoalbumin,

Myo = Myoglobin.

die weiter kathodisch der Myoglobinbande auftretenden Komponenten hinsichtlich ihrer Zahl, Intensität und Mobilität beachtlich differieren. Die Zonen 7 und 8 grenzen beim menschlichen Herzextrakt unmittelbar aneinander und sind zwischen den deutlich voneinander getrennten Banden 7 und 8 des Kalbsherzextraktes lokalisiert. Ihnen folgt eine sehr feine Komponente 9, die ebensoweit wie die kräftige Fraktion 8 des Kalbsmyokards wandert. Ein der Komponente 9 des Kalbsherzextraktes vergleichbares Protein, das näher kathodisch liegt als die gamma-Globuline des Humanserums, ist beim Menschen nicht zu finden. Umgekehrt zeigen sich beim Kalb keine entsprechenden Proteine, die in ihrer Mobilität mit den Zonen 10a, b und 11 des menschlichen Extraktes übereinstimmen. Außer den Fraktionen 1 und 6 dürfen wir keine der mit der gleichen Zahl benannten Komponenten als funktionell homologe Proteine betrachten. Bemerkenswert erscheint uns die Tatsache, daß die menschliche Myoalbuminbande im Gegensatz zum Kalbsmyoalbumin aus zwei sich überlagernden Zonen besteht, von denen die weiter kathodisch liegende in typischer Weise mit dem Serumalbumin übereinstimmt. Dies berechtigt uns zur Annahme, daß der von uns gewonnene Myokardextrakt durch Proteine aus dem im Organ verbliebenen Blut verunreinigt ist. In wie weit dies zutrifft, wird in der Diskussion ausführlicher zu behandeln sein.

IV) Vergleichende Elektrophorese mit Humanserum

Einige Herzmuskelproteine stimmen in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit mit den Proteinen des Serums überein. So liegt zum Beispiel die Myoalbumin-Bande mit dem Serumalbumin auf gleicher Höhe, die Komponente 2 etwa in der α_1 -Globulin-Fraktion, 3 im α_2 -Globulin-Bereich und Komponente 4c und 5 zu Beginn der β -Globulin-Reihe. Zwischen den Zonen α_2 und β sind die Banden 4a und b, zwischen β - und gamma-Globulinen die Komponente 6 (Myoglobin) lokalisiert. Die Gruppe 7, 8, 9, 10 und 11 verteilt sich hingegen über den gesamten gamma-Globulin-Bereich des Serums, wie Abbildung 2d veranschaulicht.

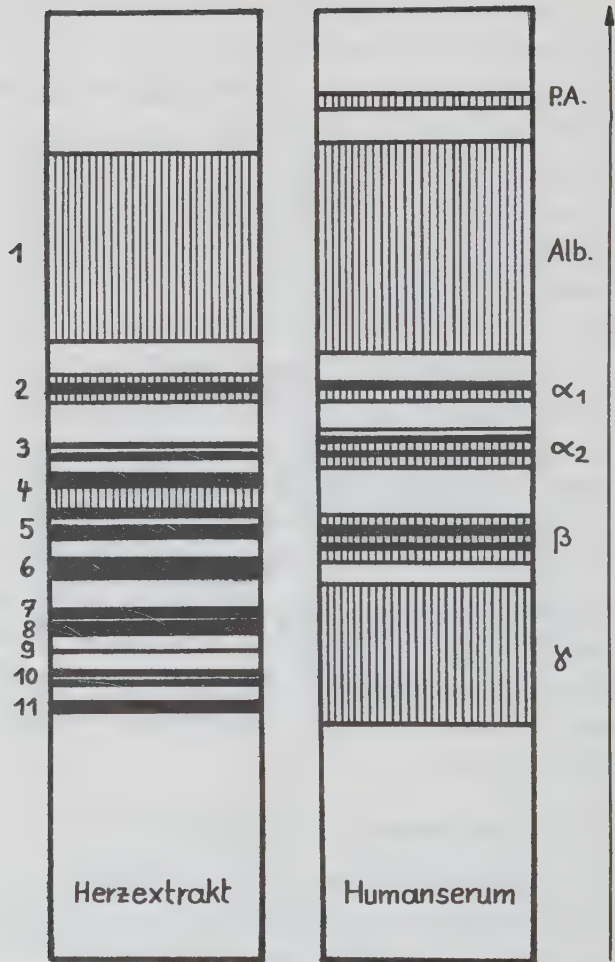


Abb. 2d: Vergleichende Elektrophorese von menschlichem Myokardextrakt und Humanserum
Halbschematisch, in natürlicher Größe,
P.A. = Präalbumin.

V) Zweidimensionale Darstellung humaner Myokardproteine

Durch die Kombination von Gelfiltration und Elektrophorese lassen sich Trennungen nach unterschiedlicher Molekülgröße und differenter Ladungsverteilung ausführen. Die Methode der zweidimensionalen Darstellung erhöht die Aussagekraft über die Charakteristika eines Stoffes enorm. Bisher wurde häufig die Technik der Dünnschichtchromatographie mit anschließender Elektrophorese zur Trennung von Serum- und Urinproteinen eingesetzt. Während Nowy und Mitarb. (68) zur Auftrennung von Kalbsherzextrakten zuerst mittels präparativer Elektrophorese vorfraktionierten und danach Säulenchromatographie folgen ließen, haben wir zur Aufschlüsselung menschlicher Myokardproteine umgekehrt verfahren, indem wir die aus der Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen einzeln der Elektrophorese unterwarfen. Zur graphischen Darstellung unserer Ergebnisse in Abbildung 3a und b haben wir in der Abszisse die fortlaufenden Fraktionen mit zugehörigen relativen Elutionsvolumina und K_{av} -Werten aufgetragen und als zweite Variable die elektrophoretische Wanderungsstrecke in die Ordinate gesetzt. Jede aus den vergleichenden Elektrophoresen eruierte Komponente ist an ihrer Stelle in all den Fraktionen fortlaufend eingetragen worden, in denen sie in Erscheinung tritt. Das Gelchromatogramm und die Elektrophorese des Gesamtextraktes sind zur Veranschaulichung nebenprojiziert. In den über mehrere Fraktionen gespreizten Zonen sind die nach bereits beschriebener Methode bestimmten Maxima als senkrechte Striche markiert. M1 und M2 sind sich, wie die Abbildungen 3a und b zeigen, auch in ihrer zweidimensionalen Darstellung gleich, wenn man von geringen Abweichungen absieht. Die bei M2 klar erscheinende Komponente 7' konnte bei M1 allerdings nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Man kann aus der Verteilung der Proteine eine gewisse Ordnung nach Gruppen ersehen. So liegt zum Beispiel das Gros der Komponenten ziemlich genau über dem Gipfel des Myoalbumins aus dem Gelchromatogramm, und die zahlenmäßig zweitstärkste Gruppe über dem Maximum des Myoglobins. Eine dritte, nicht so ausgeprägte Anhäufung ist im Bereich der 7 S-Fraktion des Chromatogramms

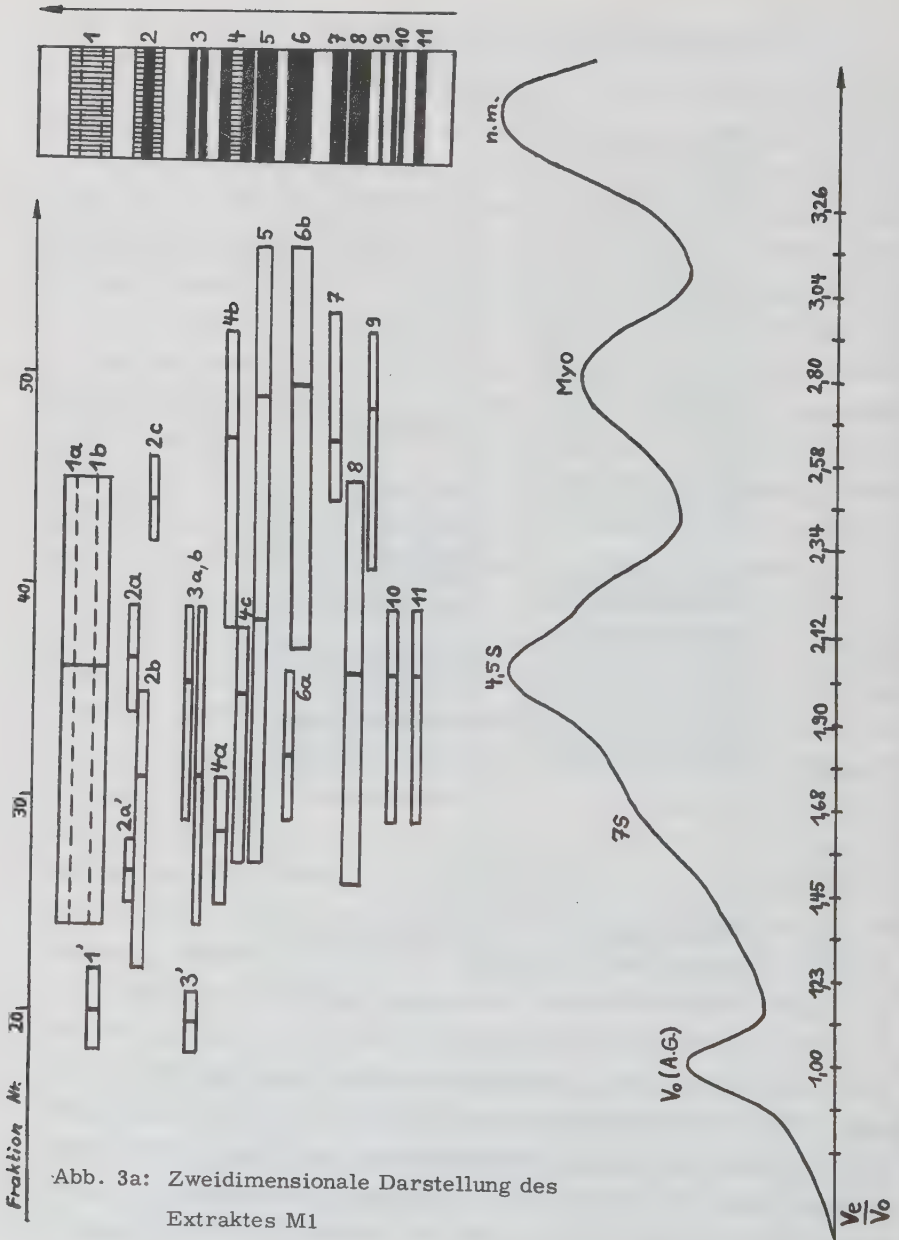


Abb. 3a: Zweidimensionale Darstellung des
Extraktes M1

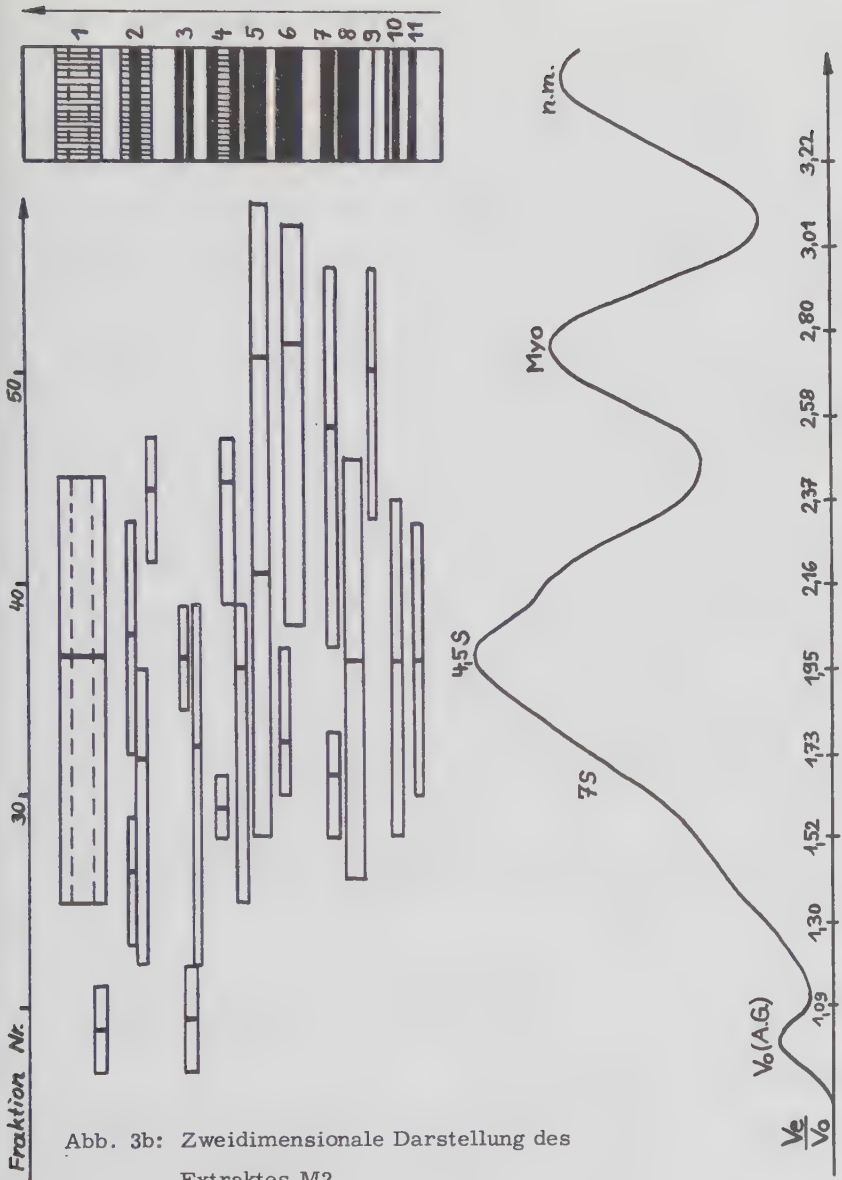


Abb. 3b: Zweidimensionale Darstellung des
Extraktes M2

zu erkennen. Zwei Banden 1' und 3' liegen nahe der V_0 -Grenze.

VI) Molekulargewichtsschätzungen

Durch wiederholte Testung der Chromatographiesäule mit geeigneten globulären Proteinen bekannter Größe stellten wir mehrere Eichkurven her, die uns dazu dienten die Molekulargewichte der einzelnen Proteinfractionen graphisch zu ermitteln. Eine genauere Molekulargewichtsbestimmung ist aber bei der großen Fehlerbreite des von uns angewandten Systems nicht möglich. Die im folgenden aufgeführten Molekülgrößen haben eine relativ hohe Schwankungsbreite, die von vielerlei Faktoren abhängt, von denen hier einige kurz erwähnt werden sollen:

Die Trennung von Proteinen durch die Gelfiltration ist eine Folge unterschiedlicher Molekülgröße, nicht aber des Molekulargewichts. Die stereometrische Konformation der Eiweißkörper, ihre Dichte und die Anzahl ionisierter Gruppen könnten sich auf die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel auswirken. Tatsächlich war von uns als Eichkurve nur eine idealisierte Gerade zu erhalten, von der einige Proteine beachtlich abwichen. Mit dem von uns praktizierten System war es nicht möglich alle chromatographischen Fraktionen auf das exakt gleiche Volumen einzuengen. Durch die damit entstandenen Schwankungen in der kolorimetrischen Intensität der Elektrophoresen konnten die Maxima der einzelnen Komponenten nur approximativ bestimmt werden. Nach längerem Gebrauch kann sich die Gelsäule mehr oder weniger absenken und komprimieren, was zur Veränderung ihrer Leistung führt.

Obwohl es unzumutbar erscheint, eine mittlere Fehlerbreite anzugeben, dürfen wir jedoch mit einiger Sicherheit annehmen, daß Abweichungen von $\pm 25\%$ der genannten Molekulargewichtsgrößen von ihrem Realwert außerhalb der Wahrscheinlichkeit liegen.

Myoalbumin (Komponente 1) zeigt stets das exakt gleiche relative Elutionsvolumen wie Serumalbumin, woraus wir schließen dürfen, daß sich die beiden Albumine hinsichtlich ihrer Molekülgröße (Mol.gew. 67.000) gleichen. Das in seiner Mobilität kurz hinter Myoalbumin folgende Protein 1' mit einem

größeren Molekulargewicht als 500.000 kann nicht sicher den Komponenten 1 oder 2 zugeordnet werden. In der Komponente 2 sind mindestens vier Untergruppen vertreten, die für sich die Molekulargewichte 35.000, 70.000, 125.000 und 200.000 errechnen ließen. In Bande 3 wurden drei Proteine eruiert, von denen das eine in seiner Größe an der Ausschlußgrenze des Gels liegt (Mol.gew. größer 500.000), während die anderen bei Molekulargewicht 70.000 und 120.000 einzuordnen wären. Für die Komponenten 4a, b und c wurden Molekulargewichte von 160.000, 30.000 und 85.000 ermittelt. Die Banden 5 und 6 sind mit je knapp 20% vom Gesamtextrakt relativ stark vertreten. Die in der Elektrophorese unter leicht rötlicher Eigenfarbe völlig homogen erscheinende Komponente 5 zeigt deutlich zwei Maxima bei 60.000 und 20.000. Vermutlich ist diese Fraktion durch Hämoglobin verunreinigt. Neben Myoglobin, für das sich ein Molekulargewicht von 17.800 errechnete, stellt sich noch eine um ein Geringes schneller wandernde Bande 6a dar, deren Größe bei ca. 115.000 liegt. Wie schon erwähnt, konnte eine Bande 7' (Mol.gew. 135.000) nur bei M2 mit Sicherheit festgestellt werden. Um niedermolekulare Proteine handelt es sich bei den Komponenten 7 (Mol.gew. 27.000) und 9 (Mol.gew. 21.000). Mit gleichen Elutionsvolumina decken sich die Maxima der Zonen 8, 10a, b und 11 mit dem Gipfel des Myoalbumins, woraus sich für diese Proteine ein Molekulargewicht von ca. 70.000 schätzen läßt.

Abschließend soll Tabelle 1 die approximativen Molekulargewichte aller elektrophoretischen Komponenten und ihrer Untergruppen übersichtlich darstellen:

Komponente:	Unter- gruppe:	Molekulargewicht:	%:
	1a	<u>67.000</u> (M.A.)	
1	1b	67.000	25,5
	1'	500.000 (A.G.)	
	2a'	200.000	
2	2a	70.000	3,5
	2b	<u>125.000</u>	
	2c	35.000	
	3'	500.000 (A.G.)	
3	3a	70.000	5,5
	3b	<u>120.000</u>	
	4a	<u>160.000</u>	
4	4b	30.000	7,0
	4c	85.000	
5	5	<u>20.000</u>	18,0
	5'	60.000	
6	6a	115.000	18,5
	6b	17.800 (Mb.)	
7	7'	135.000	5,5
	7	<u>27.000</u>	
8	8	<u>70.000</u>	
9	9	21.000	
10	10a	70.000	3,0
	10b	70.000	
11	11	70.000	2,0

Tabelle 1:

A.G. = Molekulargewicht an oder oberhalb der Ausschlußgrenze des Gels G 200. M.A. = Myoalbumin, Mb. = Myoglobin. % = Relativprozent bezogen auf den Gesamtextrakt (= 100%). Hauptbestandteile sind jeweils unterstrichen. Bei Komponente 5' handelt es sich vermutlich um Hämoglobin.

DISKUSSION:

I) Diskussion der Methodik

Die vorliegende Arbeit gibt zunächst nur eine grobe Orientierung über das Verteilungsmuster der Myokardproteine hinsichtlich ihres elektrophoretischen und chromatographischen Verhaltens. Besserer Einblick in den Aufbau der Sarkoplasmaproteine wäre durch Isolierung und Reindarstellung der Einzelkomponenten möglich. Eine weitgehende Reindarstellung von elektrophoretischen Proteinkomponenten des Kalbsherzens erreicht Nowy (68) dadurch, daß er zunächst durch kontinuierliche, trägerfreie Elektrophorese größere Mengen von noch uneinheitlichen Fraktionen herstellt, die er dann mittels mehrmaliger präparativer Papierelektrophorese weiter reinigt. Jede der auf diese Weise gewonnenen 9 Fraktionen wird anschließend gelchromatographisch aufgeschlüsselt. Die von Nowy angegebene Arbeitsweise stellt also die Umkehrung des von uns praktizierten Verfahrens dar. Eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse Nowys mit unseren am Kalbsherzen erzielten Ergebnissen hat die von uns gewählte Methode neben anderen gerechtfertigt.

Die Gelfiltration mit Sephadex ist eine gangbare Methode, Molekulargewichte von globulären Proteinen zu bestimmen. Untersuchungen von Andrews (4) haben gezeigt, daß diese Methode von prinzipiellen Fehlern behaftet sein kann. Diese liegen zunächst einmal darin begründet, daß die lineare Beziehung zwischen Elutionsvolumen und Logarithmus des Molekulargewichts eines globulären Proteins für eine bestimmte Gelsorte nur in einem begrenzten Bereich gültig ist. Andrews stellt fest, daß lineare Proportionalität für Sephadex G75 und G100 nur im Bereich von Molekulargewicht 3.500 - 60.000 und für G200 nur im Bereich von Molekulargewicht 40.000 - 200.000 besteht. Trotzdem kann er nachweisen, daß bei Zugrundeliegen der Standardbeziehung in dem auch für uns infrage kommenden Molekulargewichtsbereich eine maximale Unsicherheit von $\pm 10\%$ vorliegt. Bei den meisten von Andrews getesteten Proteinen zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Werten. Einige Proteine,

unter anderem humanes gamma-Globulin, das auch wir als Eichsubstanz verwendeten, weichen bedeutend von der Normalbeziehung ab. Die Abweichung von Katalase und weiterer Proteine führt Andrews auf ihren Gehalt an Kohlenhydraten zurück. Leach und Shea (56) stellten fest, daß Cytochrom c ein wesentlich höheres Molekulargewicht vortäuscht, als in der Literatur angegeben ist. Diskrepanzen bei der Molekulargewichtsbestimmung mit Sephadex, so weisen Siegel und Monty (80) hin, sind letztlich darin zu sehen, daß das Elutionsvolumen nicht vom Molekulargewicht, sondern vom Stoke'schen Radius eines Proteins abhängt.

Zur Vorfraktionierung unseres Extraktes haben wir uns der Gelfiltration mit Sephadex bedient. Wie unsere Ergebnisse zeigen, läßt sich mittels dieser Methode nur eine grobe Auftrennung unseres Gesamtextraktes erzielen. Wir haben bereits an anderer Stelle betont, daß es sich bei dem von uns erhaltenen Chromatogramm, das nur 4 deutlich abgrenzbare Gipfel zeigt, um das Integral vieler einzelner Fraktionen handelt. Erst die Elektrophorese jeder einzelnen Fraktion läßt uns das eine oder andere Maximum der Komponenten erkennen. Es handelt sich also hier um eine indirekte Bestimmung der Elutionsvolumina einzelner Komponenten aus deren Extinktionsmaxima bei der Elektrophorese, und es steht außer Zweifel, daß hier neben den prinzipiellen Fehlermöglichkeiten bei der Molekulargewichtsbestimmung eine zusätzliche Fehlerquelle besteht, zumal es sich schwierig gestaltet, jede einzelne Fraktion aus der Chromatographie auf das exakt gleiche Volumen einzuengen, um so vergleichbare Konzentrationen zu erhalten. Nachteilig bei der Bestimmung der Elutionsmaxima wirkt sich außerdem die relativ starke Zonenspreizung und eine zonale Asymmetrie aus. Während die Zonenspreizung durch Diffusionseigenschaften der Proteine, Durchflußgeschwindigkeit und Perlgröße bestimmt ist, scheint nach Tracey und Winzor (85) für die Zonenasymmetrie sowohl die Heterogenität der Probenlösung als auch die Konzentrationsabhängigkeit ihrer Wanderungsgeschwindigkeit verantwortlich zu sein. Zweifellos spielt auch die Viskosität hier eine gewisse Rolle. Einflüsse des Puffers als Eluanten auf die Genauigkeit der Molekulargewichtsbestimmung sind bei einer Ionenstärke

größer 0,02 und einem pH zwischen 1,3 und 10,7 (Andrews (3)) nicht festzustellen.

Die Gelfiltration hat sich für unsere Zwecke als schnelles, einfaches und schonendes Verfahren erwiesen, um vor allem im Vergleich mit der Elektrophorese eine Orientierung über die Verteilung der Proteinkomponenten hinsichtlich ihres Molekulargewichts zu gewinnen und eine weitere Aufschlüsselung der Myokardproteine zu erreichen. Für eine hinreichend genaue Molekulargewichtsbestimmung scheint uns diese Methode jedoch angesichts der bereits diskutierten Fehlermöglichkeiten ungeeignet, sodaß wir uns lediglich mit Schätzungen begnügen müssen, zumal wir von den zu untersuchenden Proteinen nicht wissen, ob sie sich wie ideale globuläre Proteine verhalten.

Gegenüber der Gelfiltration für sich allein hat die Elektrophorese als Trennverfahren zur Aufschließung unseres Myokardextraktes im Hinblick auf die Trennschärfe und die Zahl der Fraktionen größere Potenz gezeigt. So liefert die von uns verwendete Methode immerhin eine Fraktionierung des Extraktes in 11 augenscheinlich scharf abgrenzbare und zahlreiche weniger deutlich hervortretende elektrophoretische Komponenten. In Kombination mit der Gelfiltration gelingt uns die Darstellung von mindestens 24 differenten Proteinen.

Entscheidenden Einfluß auf die Qualität der Trägerelektrophorese scheint uns die Art des Trägermaterials und die Zusammensetzung des Puffers auszuüben. Es ist bekannt, daß sich die Salzkonzentration, beziehungsweise die ionale Konzentration eines Puffers, die durch seine Ionenstärke ausgedrückt wird, zum Teil erheblich auf die Löslichkeit von Proteinen im wässrigen Milieu auswirken kann. So erklären sich zum großen Teil auch die variierenden Ergebnisse in der Zusammensetzung von Proteinen, die durch Extraktion und Dialyse aus Muskelgewebe mit Puffern hoher oder niedriger Ionenstärke gewonnen werden. Die Trennweite bei der Trägerelektrophorese wird, worauf auch Nowy (68) hinweist, entscheidend durch die Ionenkonzentration des Puffers bestimmt, und zwar derart, daß mit steigender Konzentration die Trennweite geringer wird. Unabhängig

von der Ionenstärke vermögen verschieden zusammengesetzte Puffer zu unterschiedlichen Pherogrammen des gleichen Serums führen. Cooper (16) bemerkt einen beschleunigenden Effekt von Boratpuffer auf einige Komponenten des Serums, was u.a. zur Darstellung von Praealbumin führt. Aronsson und Grönwall (5) entwickeln einen zusammengesetzten Puffer, der auch hier Verwendung findet und der die Trennung des Serums in 9 Komponenten erlaubt. Bei der Untersuchung der Wirkung 6 verschiedener Puffer auf die Acrylamidgel-Elektrophorese des Serums finden Ferris u. Mitarb. (31) stark variierende Ergebnisse, ohne jedoch einem Puffer in allen Aspekten den Vorzug geben zu können. Moreau-Collinet und Hamoir (61) prüfen die Extrahierbarkeit und elektrophoretische Mobilität von Muskelextrakten niederer Ionenstärke unter Anwendung 7 verschiedener Puffer und stellen fest, daß Pyrophosphationen die höchste Affinität zum Protein besitzen und damit maximale Mobilität bewirken, bemerken aber, daß trotz starker Einflüsse der Puffer das Gesamtaussehen der Pherogramme beibehalten wird.

Celluloseacetat als Trägermaterial für die Elektrophorese zeichnet sich nach Kohn (50) besonders durch chemische Reinheit, minimale Eiweißadsorption, scharfe Abgrenzung der Zonen, völlige Durchlässigkeit für UV-Licht ab 250 nm und Eignung zur Eichung nach Proteinkonzentrationen aus. Schnelles und vollständiges Färben, Entfärben und Klären der Celluloseacetatfolien nach der von Clark und Jones (15) untersuchten und von uns verwendeten Methode stellen einen weiteren Vorteil dar. Vergleiche von Papier- und Celluloseacetatelektrophorese an Normalseren durch Oriol-Bosch und Voigt (69) ergaben, daß bei der Celluloseacetatelektrophorese zusätzlich regelmäßig Präalbumin und zwei β -Globulinbanden zur Darstellung kommen. Die papierelektrophoretische Trennung von Muskeleiweiß, wie sie u.a. von Demling u. Mitarb. (21) durchgeführt worden ist, erweist sich nach Bauer u. Mitarb. (7) wegen der geringen Trennschärfe als weniger aussichtsreich. Unter Verwendung von Stärkegel als Träger kann Hughes (39) 12 scharf getrennte Komponenten löslicher Muskelproteine nachweisen. Bauer u. Mitarb. stellen mittels Agargel-Elektrophorese wässriger Extrakte aus menschli-

cher Muskulatur 5 - 8 Fraktionen dar.

Die beste Auftrennung der Muskelproteine wäre zweifellos durch die Anwendung der Polyacrylamidgel-Elektrophorese möglich. Das stabile Gel, das in seiner Porengröße modifizierbar ist und sich wegen seiner Klarheit zur direkten Transmissionsphotometrie eignet, erlaubt sogar, wie Raymond und Weintraub (72) feststellen, eine Subfraktionierung der gamma-Globuline des Serums. Ott (70) beschreibt die Darstellung von 15 - 20 Komponenten des Normalserums mittels dieser Methode. Auf Objektträgern gelingt Götze u. Mitarb. (35) die Auftrennung des Serums in 18 integrativ auswertbare Banden. Ritchie u. Mitarb. (74) haben eine verfeinerte Methode der Acrylamidgel-Elektrophorese entwickelt, mit deren Hilfe sich Serum in Konzentrationen bis zu 10 Mikrogramm/ml in mehr als 30 Fraktionen mit einem Proteingehalt unter 0,1% aufschließen läßt. Erst kürzlich haben Mittelbach und Hamburger (59) die Proteinfractionen des menschlichen Skelettmuskels mittels direkter Gewebs-Disk-Elektrophorese auf Polyacrylamidgel untersucht und regelmäßig 19 Banden nachgewiesen.

Die Anwendung der Acrylamidgelelektrophorese als Methode zum Nachweis menschlicher Myokardproteine erscheint uns nur dann sinnvoll, wenn es gelänge, alle Blutproteine aus dem Myokard zu entfernen. Im vorliegenden Material ist jedoch sicher mit Beimengungen von Serumeiweiß und Hämoglobin zu rechnen. In Tierversuchen kann dieses Problem umgangen werden, indem man, wie es z.B. Nowy (64) am Kaninchenherzen durchführt, das noch schlagende Herz in corpore mit vorgewärmter Ringerlösung solange durchspült, bis es vom Blut ausgewaschen ist. Am Autopsiematerial, auf das wir angewiesen waren, hat sich eine Spülung der Koronarien als weniger wirksam erwiesen. Hughes (40) beobachtet bei der Elektrophorese menschlicher Muskelextrakte zwei Albuminkomponenten, von denen die langsamer wandernde, in Einklang mit unseren eigenen Ergebnissen, mit dem Serumalbumin übereinstimmt, und führt deren Zunahme im atrophischen Muskel auf die Änderung der Verhältnisse von Intrazellulär- zu Extrazellulärraum zurück. Ein Vergleich der Pherogramme von blutiger und ausgebluteter Muskulatur durch Bauer u. Mitarb. (7) ergibt außer be-

achtlichen Differenzen in der Albuminfraktion keine signifikanten Unterschiede. Erst bei Zusatz von Serum in größeren Mengen zeigt sich eine wesentlich andere Konfiguration der Banden. Neben Serumalbumin dürfte auch mit störender Beimengung von Hämoglobin zu rechnen sein, da dieses bei der Gelfiltration und der Elektrophorese bereits durch seine charakteristische, rötliche Eigenfarbe auffällt. Wir werden an anderer Stelle noch zu klären versuchen, welche der von uns nachgewiesenen Proteine wahrscheinlich aus dem im Myokardgewebe verbliebenen Blut stammen.

Unser Untersuchungsmaterial ist im Laufe seiner Aufarbeitung unphysiologischen physikalischen Einflüssen unterworfen worden. Poel (71) weist darauf hin, daß die Homogenisierungszeit bei der Aufschließung von Muskelgewebe so kurz wie möglich gehalten werden sollte, da es zu Proteindenaturierungen durch die Oxidation von SH-Gruppen und zur Inaktivierung von Dehydrogenasen kommen kann. Eine Arbeitsdauer von 2 min, die wir stets einhielten, ist nach Stern und Bird (82) jedoch tragbar. Kronmann und Winterbottom (53) stellen eine Abnahme der Extrahierbarkeit wasserlöslicher Proteine aus Rindermuskel nach 7-tägiger Lagerung bei 3°C oder nach Kühlung bei -20°C für 5 Wochen fest. Gegenüber frischem Muskel zeigen die Sedimentationsdiagramme der Extrakte von "gefrorener" und "gealterter" Muskulatur eine Zunahme der Proteine mit niederem Molekulargewicht bei gleichzeitiger Abnahme der Proteine mit höherem Molekulargewicht. In der Elektrophorese nehmen die Komponenten mit geringerer Mobilität zu und die mit höherer Mobilität ab. Nach langsamer Erwärmung gefriergetrockneten Gewebes auf Zimmertemperatur tritt nach MacKenzie und Luyet (58) kein Verlust in der Löslichkeit der Proteine ein. Von Bauer und Mitarb. (7) ist eine nennenswerte Änderung der Pherogramme von Muskelextrakten weder durch zweimonatige Lagerdauer bei -20°C, noch durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren beobachtet worden. Auch wir können nach längerer Lagerung bei Tiefkühltemperaturen keine qualitative Änderung in der Proteinzusammensetzung der Myokardextrakte feststellen. Nach Katz und Kalow (46), Scheiffarth (78) und Richterich (73), die das Isoenzymmuster von Muskelgewebe untersuchen, besteht kein Unterschied

zwischen Biopsie- und Autopsiematerial.

II) Diskussion der Ergebnisse

In der Literatur findet sich eine beachtliche Varianz der Ergebnisse, was die Anzahl der Eiweißfraktionen aus Muskelgewebe und ihre elektrophoretische Konfiguration betrifft. Die Ursache hierfür ist sicherlich in der Vielfältigkeit der Trennverfahren einerseits und in der Unterschiedlichkeit der Extraktionsbedingungen andererseits zu suchen. Wir haben darauf hingewiesen, daß die Extraktion von Proteinen entscheidend von der Ionenstärke der verwendeten Lösung abhängt. Wie Bosch (11) feststellt, ändert sich die Eiweißzusammensetzung von Muskelextrakten unter Variation der Ionenstärke nicht allmählich, sondern abrupt, sodaß die mit Lösungen schwacher Ionenstärke extrahierten Proteine eine gut definierte Klasse bilden, die wir mit Vorbehalt als Proteine des Sarkoplasmas bezeichnen dürfen. Grundlage unserer Untersuchungen sind die mit destilliertem Wasser extrahierbaren Proteine des Myokards, von denen wir mit Sicherheit behaupten dürfen, daß sie frei von kontraktilen Elementen sind, zumal die Gewinnung der kontraktilen Fraktion eine höhere Ionenstärke erfordert. Es ist anzunehmen, daß unser Untersuchungsmaterial größtenteils, jedoch nicht ausschließlich aus Sarkoplasmaeiweiß besteht. Nach Hulsmans (41) lassen sich Sarkosomen und größere Zellstrukturen bei 33.000 g vollständig sedimentieren, während zur Abtrennung der Mikrosomenfraktion Beschleunigungen von 105.000 g nötig sind. Amberson u. Mitarb. (2), die sich mit der Bindung glykolytischer Enzyme an die Ultrastrukturen der Zelle befassen, stellen in Muskelhomogenaten gegenüber Muskelpressäften doppelte Enzymaktivitäten fest. Durch Homogenisieren von Herzmuskel wird nach Borst und Peeters (10) sowohl die cytoplasmatische als auch die strukturgebundene GOT freigesetzt. Ähnliche Beobachtungen bei anderen Enzymen werden in der Literatur beschrieben.

Im vorliegenden Herzmuskelextrakt ist sicher mit Beimengungen von Proteinen aus dem Blut zu rechnen. In der Elektrophorese scheinen jedoch lediglich Serumalbumin und Hämoglobin, die prozentual den höchsten

Anteil unter den Blutproteinen bestreiten, zur Darstellung zu kommen, da die Konzentrationen anderer Eiweißkomponenten zu gering sind. Wenn wir nach Kössler (51) einen Blutgehalt des Herzmuskels von etwa 5,5% (bezogen auf das Frischgewicht) zugrundelegen und einen normalen gamma-Globulingehalt von 1,8 g% annehmen, so resultiert daraus ein maximaler gamma-Globulingehalt von 0,1%. Während Extrakt M1 keine Komponente aufweist, die sowohl in der Mobilität als auch im Molekulargewicht annähernd den gamma-Globulinen entspricht, zeigt M2 die Komponente 7', die möglicherweise eine Verunreinigung durch diese Serumfraktion darstellt. Übereinstimmend mit Hughes (40) Ergebnissen ist mit größter Wahrscheinlichkeit Serumalbumin durch die gegenüber Myoalbumin etwas langsamere Bande 1b vertreten. Der Beweis hierfür wäre durch das Farbstoffbindungsvermögen der Fraktion 1 zu erbringen, da serumfreies Myoalbumin, wie Leidl (57) nachweist, kein Evansblue bindet. Die Lokalisation von Hämoglobin dürfte schwieriger festzulegen sein, zumal dieses Protein bekanntlich mit Serum-eiweiß Bindungen eingehen kann. Nach Zusatz größerer Mengen Hämoglobin zu Serum stellen Aber und Rowe (1) neben der Bindung an Haptoglobin auch eine Wanderung des Hämoglobins mit Albumin und β -Globulin in der Träger-elektrophorese fest. Nach unserer Methode zeigt die Elektrophorese von freiem Hämoglobin eine breite Zone, die in den Bereich zwischen Fraktion 3 und 6 zu liegen kommt, und es wäre denkbar, daß die schwach rötliche Fraktion 5' dieses Protein verkörpert. In manchen Fällen haben wir eine zarte Rottönung der Albuminbande beobachtet, doch wir wissen nicht, ob eine Bindung von Hämoglobin an Muskeleiweiß möglich ist. Nach Schmutterer (79) und Leidl (57) kann in den löslichen Proteinen des Kalbsherzens eine Bilirubin und Evansblue bindende Fraktion nachgewiesen werden, die in ihrer elektrophoretischen Mobilität und bezüglich ihrer immunologischen Eigenschaften den α_2 -Globulinen des Serums entspricht.

Durch seine braune Eigenfarbe fällt bereits auf der ungefärbten Elektrophoresefolie eine kräftige, homogene, scharf begrenzte Fraktion 6b, das Myoglobin, auf. Eine elektrophoretische Inhomogenität des Myoglobins verschiedener Tierarten wird vielfach in der Literatur beschrieben. Bei einer

Untersuchung über die Bindung von Hundemyoglobin an das Plasma beobachtet Lathem (54), daß das bei pH 7,0 elektrophoretisch völlig einheitliche, freie Myoglobin sich bei pH 8,6 in zwei Banden aufspaltet. Blessing (9), der sich eingehend mit dem Myoglobin des menschlichen Herzmuskels befaßt, gelingt mittels Stärkegelelektrophorese eine Auftrennung des Proteins in 4 Fraktionen. Wir nehmen an, daß sich Myoglobin nach unserer Methode als einzelne Fraktion darstellt, möchten aber nebenbei der Tatsache Beachtung schenken, daß die Komponenten 5 und 9 ein diesem Protein sehr ähnliches Molekulargewicht besitzen.

Auch Myoalbumin stellt sich bei uns als einheitliche Fraktion dar, obwohl Formanek (32) mittels Acrylamidgelelektrophorese 3 Myoalbuminkomponenten nachweisen kann. Die Existenz von Prämyoalbumin können wir zwar im Kalbsherzen, nicht aber im menschlichen Herzmuskel bestätigen. Immunelektrophoretische Studien, wie sie Nowy (67), Bauer (7) und Formanek (32) anstellen, ergeben eine absolute immunologische Identität zwischen Myoalbumin und Serumalbumin.

Die Organspezifität löslicher Muskelproteine ist durch die Beobachtung immunologischer Reaktionen von Antiserum mit Muskelproteinen wiederholt in Frage gestellt worden. Nowy (67) findet beim Kaninchenherzen neben der Präzipitation von Antiserum mit Myoalbumin zwei weitere Reaktionen im Bereich der β - und gamma-Globuline. Bauer u. Mitarb. (7) diskutieren die Identität menschlicher Muskelproteine mit Albumin, α_1 -Lipoprotein, α_1 -Glykoprotein, α_2 -Makroglobulin, Transferrin und gamma-Globulin, finden aber andererseits drei möglicherweise muskeleigene Komponenten. Scheiffarth u. Mitarb. (78) beobachten, daß spezifisches Antiherzserum trotz Variation der Bedingungen nur mit Albumin präzipitiert, während Antihumanserum gegen Herzextrakt bis zu 10 Fällungslinien bildet. Die genannten Autoren beschreiben auch Kreuzreaktionen verschiedener Antiorganseren gegen andere Organe. Durch die Verunreinigung der Organe mit Serumeiweiß sind dem Identitätsnachweis von Serum- und Muskelproteinen Grenzen gesetzt. Außerdem wird auch der Aufenthalt von Serumeiweiß im Interzellularraum und Bindegewebe diskutiert. Gitlin u. Mitarb. (34) können immunfluoreszenz-

technische Serumproteine zwar im Endothel und Bindegewebe des Perikards, Endokards und Myokards, nicht aber im Intrazellulärraum der Herzmuskelzellen nachweisen.

Die Pherogramme der Extrakte aus M1 und M2 erweisen sich, von minimalen Abweichungen abgesehen, als kongruent, und es scheint, daß individuelle Unterschiede in der Eiweißzusammensetzung eines Organs nicht bestehen oder nicht relevant werden. Unter 7 Individuen können Grouchy und Roubin (37) keine nennenswerten Differenzen im Proteinmuster gleicher Organe beobachten.

Vergleicht man Herz- und Skelettmuskelextrakte der selben Spezies, so ergibt sich ein eindrucksvoller Unterschied im Proteinmuster. Signifikant ist, wie Nowy (67) feststellt, unter anderem der verschwindend geringe Myoalbuminanteil des Skelettmuskels gegenüber dem Herzmuskel. Unsere Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, daß auch die Eiweißzusammensetzung von Kalbs- und Menschenherz beachtlich differiert. Vergleichende elektrophoretische Untersuchungen durch Nowy u. Mitarb. (65) ergeben vor allem beim Herzmuskel je nach Tierart variierende Pherogramme. Nach Bauer (7) gleicht sich keines der Skelettmuskelpherogramme 6 verschiedener Spezies hinsichtlich der Mobilität und Anordnung der Komponenten. Nowys (67) Studien haben gezeigt, daß sogar innerhalb des Herzens quantitative Unterschiede zwischen linkem und rechtem Ventrikel und dem Vorhof bestehen. Derartige Ergebnisse sind auch von Cruck (17) bei ähnlichen Untersuchungen erhalten worden. Die Elektrophorese von Extrakten aus dem Reizleitungssystem weist nach Helander (38) zusätzliche Komponenten auf, die in den übrigen Myokardabschnitten fehlen und Ähnlichkeit zu Proteinen aus Nervengewebe besitzen.

Sicherlich kommt den Unterschieden in der Proteinzusammensetzung verschiedener Muskelarten und Teilen des Herzens in erster Linie funktionelle Bedeutung zu. Um den Erfordernissen der Funktion gerecht zu werden, wird die Ausstattung der Organe mit Enzymen, Transport- und Reserveproteinen dementsprechend vielgestaltig sein. Wenn man von Muskeln mit rascher Kontraktion zu solchen mit langsamer Kontraktion übergeht,

bemerkt man nach Crepax (18) eine allmähliche Abnahme der Bestandteile der Myogengruppe einerseits und eine Zunahme des Myoalbumins andererseits.

Die Elektrophorese von Organextrakten ermöglicht auch die Darstellung pathologischer Veränderungen im Muskelgewebe. Im experimentell hypertrophischen Myokard stellt Nowy (66) eine Zunahme der Actomyosinkonzentration von rund 30% und eine Abnahme des nichtkontraktilen Eiweißes um ca. 25% fest. Einen erheblichen Verlust an Myoglobulin und weiterer Komponenten bei gleichzeitiger Zunahme des relativen Myoalbumingehalts wird von Hughes (40) bei Skelettmuskelatrophie beobachtet. Mittelbach und Hamburger (60) finden Unterschiede im Proteinmuster von Muskeln mit neurogener Atrophie, Myopathie und Myositis. Sie verstärken die Aussagekraft ihrer Untersuchungen erheblich durch die Darstellung der Isoenzymverteilung in den drei Muskelgruppen.

Wir haben bereits eingangs betont, daß die Proteine des Sarkoplasmas zu einem wesentlichen Prozentsatz aus Enzymen bestehen. Durch pathologische Vorgänge verursachte Gewebsläsionen können bekanntlich zur Freisetzung von Fermenten führen, die sich dann im Serum nachweisen lassen. Bei komplexen Krankheitsbildern ist häufig eine eindeutige Organdiagnose, die sich durch die Messung enzymatischer Gesamtkativitäten nicht stellen läßt, wünschenswert. Hier hat die Erforschung der Isoenzymmuster von Organextrakten vorbildliches geleistet. Wieme (90) findet im Serum von Patienten mit Myokardinfarkt die am weitesten anodisch wandernden LDH-Fraktionen I und II vermehrt, während Hepatitiden nur eine Zunahme der kathodischen Fraktionen und Karzinome und Leukämien einen Anstieg aller LDH-Isoenzyme zeigen. Detaillierte Untersuchungen über LDH-Enzymogramme bei Patienten mit verschiedensten Erkrankungen werden von Wroblewsky (91) durchgeführt. Dikow (24) bemerkt eine charakteristische Erhöhung einiger Aldolase-Isoenzyme bei Herzinfarkt. Hohen diagnostischen Wert bei Herzinfarkt besitzt nach Kamaryt und Szavorka (44) die gleichzeitige Darstellung von LDH-, GOT- und MDH-Isoenzymen. Absolut herzspezifische Fermentnachweise sind, soweit wir informiert sind, bis-

her nicht gefunden worden.

Es wäre interessant, mehr über die Anzahl und die Lokalisation von Isoenzymen in der Organelektrophorese des menschlichen Herzmuskels zu erfahren. Über die Zuordnung von GOT- und CPK-Isoenzymen zu den elektrophoretischen Komponenten von Kalbsherzproteinen wird z.B. von Erdely (29) berichtet. Weitere Untersuchungen über die Proteinzusammensetzung des menschlichen Myokards mit verfeinerten elektrophoretischen Methoden unter Einbeziehung der Lokalisation von Isoenzymen im Pherogramm, etwa in der Art wie sie Mittelbach und Hamburger (59, 60) am Skelettmuskel durchführen, könnten weitere wichtige Informationen liefern.

ZUSAMMENFASSUNG:

Die löslichen, nicht kontraktilen Proteine des menschlichen Herzmuskels werden durch Gelfiltration fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen werden der horizontalen Membranelektrophorese unterworfen und mit dem Pherogramm des Gesamtextraktes verglichen. Diese zweidimensionale Auftrennung der Myokardproteine hinsichtlich ihres chromatographischen Verhaltens und ihrer elektrophoretischen Mobilität führt zur Darstellung von 24 Eiweißkomponenten, deren Molekulargewichte aus der Größe ihrer relativen Elutionsvolumina anhand von Eichungen geschätzt werden kann. Das elektrophoretische Muster des menschlichen Herzextraktes wird mit Pherogrammen von Kalbsherzextrakten und Humanserum verglichen.

LITERATURVERZEICHNIS:

1. ABER, G.M., D.S. ROWE:
Electrophoresis of Haemoglobin with Serum
Proteins. Brit. J. Haemat. 6, 166 (1960)
2. AMBERSON, W.R., F.J. ROISEN, A.C. BAUER:
The Attachment of Glycolytic Enzymes to Muscle
Ultrastructure
J. Cell. an Comp. Physiol. 66, 71 (1965)
3. ANDREWS, P.:
Biochem. J. 91, 222 (1964)
4. ANDREWS, P.:
The Gel-Filtration Behaviour of Proteins Related
to their Molecular Weights over a Wide Range.
Biochem. J. 96, 595 (1965)
5. ARONSSON, T., A. GRÖNWALL:
Improved Separation of Serum Proteins in Paper-
Electrophoresis - A New Electrophoresis Buffer.
Scandinavian J. Clin. Labor. Investig. 9, 338 (1957)
6. BARANOWSKY, T.:
Hoppe-Seylers Z. phys. Chem. 260, 43 (1939)
7. BAUER, H., F. GLÖTZNER, I. SCHWARZE, K. SCHMALBACH:
Elektrophoretische und immuno-elektrophoretische
Studien über Muskelproteine.
Klin. Wschr. 42, 1198 (1964)
8. BLANCHAEER, M.C.:
Clin. Chim. Acta Amsterdam 6, 272 (1961)
9. BLESSING, M.H.:
Über den Myoglobingehalt des Herzmuskels des
Menschen. Arch. Kreisl.-Forsch. 52, 236 Frankfurt
(1967)

10. BORST, P., E.M. PEETERS:
The Intracellular Localisation of Glutamate-
Oxalacetate Transaminase in Heart.
Biochim. Biophys. Acta 54, 188 (1961)
11. BOSCH, M.W.:
Quantitative Electrophoretic Study of Rabbit
Muscle Proteins Soluble in Dilute Salt Solutions.
Biochim. Biophys. Acta 7, 61 New York (1951)
12. BÜCHER, T., G. BEISENHERZ, H. BOLTZE:
Z. Naturforsch. 8B, 555 (1953)
13. BURGER, A., R. RICHTERICH, H. AEBI:
Die Heterogenität der Kreatinkinase.
Biochem. Z. 339, 305 (1964)
14. CHRISTEN, P., U. RENSING, A. SCHMID, F. LEUTHARDT:
Multiple Formen der Aldolase in Organextrakten
der Ratte.
Helvet. Chim. Acta 49, 1872 (1966)
15. CLARK, A., G.R. JONES:
Färben und Klären von Celluloseacetat-Phe-
rogrammen. Clin. Chim. Acta 11, 483 (1965)
16. COOPER, D.R.:
Effect of Borate Buffer on the Electrophoresis
of Serum. Nature 181, 713 (1958)
17. CRUCK, S.: Contribution a la Biochimie Comparee des
Proteines Musculaires dans les Differents Com-
partiments du Coeur.
Biochim. Biophys. Acta 10, 630 (1953)

18. CREPAX, P.: Etude Electrophoretique D'Extraits de Muscule
Doues de Differentes Proprietees Morphologiques
et Fonctionelles. Biochim. Biophys. Acta 9, 385 (1952)
19. DAWSON, D.M., H.M. EPPENBERGER, N.O. KAPLAN:
The Comparative Enzymology of Creatine Kinases.
J. Biol. Chem. 242, 210 (1967)
20. DECKER, L.E., E.M. RAU:
Multiple Forms of Glutamic-Oxalacetic
Transaminase in Tissues
Proc. Soc. Exp. Biol. 112, 144 N.Y. (1963)
21. DEMLING, L., H. KINZLMEIER, N. HENNING:
Über die quantitative Zusammensetzung der Organ-
proteine. Z. ges. exp. Med. 122, 416 (1954)
22. DETERMANN, H.:
Gelchromatographie - Ein Laboratoriumsbuch
Springer, Berlin, Heidelberg, N.Y. (1967) XI.
23. DIKOW, A.L., S.N. TSCHAKYRON:
Untersuchungen über die Aktivität und die Isoenzym-
muster der F.P. - Aldolase im Serum von Hunden
mit exp. Myokardinfarkt
Z. klin. Chem. 7, 553 (1969)
24. DIKOW, A.L.: Z. klin. Chem. 7, 278 (1969)
25. DISTECHE, A.:
Etude des Conditions de Precipitation et de
Cristallisation de Proteines Musculaires du Groupe
Myogene. Biochim. Biophys. Acta 2, 265 (1948)
26. DISTECHE, A.:
A New Cristalline Protein of the Myogen Group.
Nature 164, 70 (1949)

27. DISTECHE, A.:
Biochim. Biophys. Acta 10, 524 (1953)
28. DUBUISSON, M.:
Biochim. Biophys. Acta 4, 25 (1950)
29. ERDELY, T.: Dissertation München 1969
30. FELLEBERG, R. v., H. M. EPPENBERGER, A. BURGER,
R. RICHTERICH, H. AEBI:
Elektrophoretisch different wandernde Pyruvat-
kinasen aus einigen Organen der Ratte.
Helv. physiol. pharmacol. Acta 21, C13 (1963)
31. FERRIS, T. G., R. E. EASTERLING, R. E. BUDD:
Electrophoresis of Serum Proteins in Acrylamid Gel -
Effect of Buffers on Separation and Mobility.
Analyt. Biochem. 8, 477 (1964)
32. FORMANEK, K., R. KASCHNITZ, J. PATSCH:
Über die molekulare Heterogenität von Myo-
albumin aus Rattenmuskulatur.
Hoppe-Seylers Z. phys. Chem. 348, 1352 (1967)
33. FÜRTH, O. v.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol.
Pharmakol. 36, 230 (1895)
34. GITLIN, D., B. H. LANDING, A. WIPPLE:
The Localisation of Homologous Plasma Proteins
in Tissues of Young Human Beings as Demonstrated
with Fluoreszent Antibodies
J. exp. Med. 97, 163 (1953)
35. GÖTZ, H., F. SCHEIFFARTH, M. EBERL:
Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Objekt-
trägern. Z. klin. Chem. 8, 306 (1970)

36. GRAIG, F.A., J.C.SMITH:
Science 156, 254 (1967)
37. GROUCHY, J.de, M.ROUBIN:
Proteines et Enzymes Tissulaires - Une Etude par
Electrophorese en Gel D'Amidon
Rev.franc.Et.clin.biol. 5, 286 (1960)
38. HELANDER, E.:
Studies of Chemical Components of the Conducting
System of the Heart. Cardiologia 47, 146 (1965)
39. HUGHES, B.P.:
The Electrophoresis of Some Human Muscle
Proteins on Starch Gels
Biochem.biophys.Res.Comm. 1, 194 (1959)
40. HUGHES, B.P.:
Effect of Degeneration on the Albumin Components
of Human Muscle Extracts. Nature 188, 1028 (1960)
41. HULSMANS, H.A.M.:
Microsomes in Heart Muscle Homogenates
Biochim.Biophys.Acta 54, 1 (1961)
42. JACOB, J.J.C.:
Electrophoresis of Muscle Extracts
Biochem.J. 41, 83 (1947)
43. JOHNSON, M.K.:
Biochem.J. 77, 610 (1960)
44. KAMARYT, J., Z.ZAZVORKA:
Die Enzymelektrophorese der Malatdehydrogenase.
Clin.Chim.Acta 9, 559 (1964)
45. KAR, N.C., C.M.PEARSON:
CPK - Isoenzymes in Muscle in Human Myopathies.
Amer.J.chir.Path. 43, 207 (1965)

46. KATZ, A.M., W.KALOW:
Electrophoretic Characterization of Human
Dehydrogenase. Canadian J. Biochem. 43, 1653
(1965)
47. KLEINE, T.O.:
Zur Lokalisation der Creatinkinase im Skelett-
muskel des Menschen
Clin.Chim.Acta 11, 85 (1965)
48. KLEINE, T.O.:
Nature 207, 1393 (1965)
49. KOHN, J.: A Cellulose Acetate Supporting Medium for Zone
Electrophoresis. Clin.Chim.Acta 2, 297 (1957)
50. KOHN, J.: Zur Technik der Celluloseacetat-Elektrophorese.
Ärztlich.Lab. 10, 233 und 269 (1964)
51. KÖSSLER, A.T.:
Eine Methode zur Blutbestimmung in Muskelpro-
ben mittels Sephadex.
Acta Biol.Med. German. 13, 814 (1964)
52. KRONMANN, M.J., L.E.WEINBERGER, R.J.WINTERBOTTOM:
The Water Soluble Proteins of Bovine Skeletal Muscle.
Arch.Biochem. 86, 238 (1960)
53. KRONMANN, M.J., R.J.WINTERBOTTOM:
Post Mortem Changes in the Water Soluble Proteins
of Bovine Skeletal Muscle During Aging and Freezing
J.agric.Food Chem. 8, 67 (1960)
54. LATHAM, W.: The Binding of Myoglobin by Plasma Protein
J.exp.Med. 111, 65 (1960)

55. LAURENT, T.C., J.KILLANDER:
A Theory of Gel Filtration and its Experimental
Verification. J.Chromatogr. 14,317 (1964)
56. LEACH, A.A., P.C.O'SHEA:
The Determination of Protein Molecular Weights
of up to 225.000 by Gel-Filtration on a Single Column
of Sephadex G 200
J.Chromatogr. 17,245 und 251 (1965)
57. LEIDL, L.F.J.:
Dissertation München 1969
58. MACKENZIE, A.P., B.J.LUYET:
Freeze-Drying and Protein Denaturation in Muscle
Tissues; Losses in Protein Solubility.
Nature 215,83 (1967)
59. MITTELBACH, F., K.HAMBURGER:
Die Proteinfraktionen des menschlichen Skelettmuskels
in der direkten Gewebs-Disc-Elektrophorese und ihre
Zuordnung zu verschiedenen Enzymaktivitäten
Klin.Wschr. 47,811 (1969)
60. MITTELBACH, F., K.HAMBURGER:
Vergleichende elektrophoretische Untersuchungen
über Muskelproteine bei normalen, neurogen
atrophischen und myopathisch veränderten Skelett-
muskeln. Klin.Wschr. 48,212 (1970)
61. MOREAU-COLLINET, C., G.HAMOIR:
Influence de la Nature du Tampon sur les Dia-
grammes Electrophoretiques d'Extraits Musculaires.
Arch.int.Physiol. 69,121 (1961)

62. MORINO, Y., H.KAYAMIYAMA, H.WADA:
Immunochemical Distinction between GOT from
Soluble and Mitochondrial Fractions of Mammalian.
J.Biol.Chem. 239, 943 (1964)
63. NISSELBAUM, J.S., O.BODANSKY:
J.Biol.Chem. 236, 323 (1961)
64. NOWY, H., W.SEITZ:
Elektrophoretische Untersuchungen des fixierten
Kaninchenherzen.
Z.ges.eyp.Med. 126, 1 (1955)
65. NOWY, H., R.BLASIUS, O.KARL:
Vergleichende Elektrophoretische Untersuchungen
von Herz- und Skelettmuskelproteinen verschiedener
Tierarten. Z.ges.exp.Med. 126, 12 (1955)
66. NOWY, H., H.D.FRINGS, A.WALCHER, L.TENDERICH:
Proteinzusammensetzung des Myokards bei ex-
perimenteller Herzhypertrophie
Z.ges.exp.Med. 131, 478 (1959)
67. NOWY, H.: Elektrophoretische Analysen von Herzmuskel-
proteinen. Mat.Med.Nordmark 17, 509 (1965)
68. NOWY, H.: Molekulargewichtsschätzung elektrophoretischer
Komponenten von Herzmuskelproteinen
Nicht veröffentlichte Arbeit
69. ORIOL-BOSCH, A., K.D.VOIGT:
Über die Anwendung einer Cellulose-Acetat-Folie
für die Eiweißelektrophorese
Klin.Wschr. 37, 758 (1959)
70. OTT, H.: Med.Welt 2, 2697 (1960)
71. POEL, W.E.: Science 108, 390 (1948)

72. RAYMOND, S., L. WEINTRAUB:
Acrylamidgel as a Supporting Medium for Zone
Electrophoresis. *Science* 130, 711 (1959)
73. RICHERICH, R., P. SCHAFFROTH, H. AEBI:
A Study of LDH Isoenzyme Patterns of Human
Tissues. *Clin. Chim. Acta* 8, 178 (1963)
74. RITCHIE, R. F., J. G. HARTER, T. B. BAYLES:
Refinements of Acrylamide Electrophoresis
J. Lab. Clin. Med. 68, 842 (1966)
75. ROMEL, W. C., S. J. LaMANCUSA:
Clin. Chem. 11, 131 (1965)
76. ROSALKI, S. B.:
Creatine Phosphokinase Isoenzymes
Nature 207, 414 (1965)
77. RUTTER, W. J., B. M. WOODFIN, R. E. BLOSTEIN:
Enzymic Homology, Structural and Catalytic
Differentiation of FDP-Aldolase
Acta chem. scand. 17, Suppl. 1, 226 (1963)
78. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ, G. THUMA:
Immunelektrophoretische Studien zur Frage der
Identität menschlicher Organ- und Serumproteine.
Clin. Chim. Acta 7, 335 (1962)
79. SCHMUTTERER, E.:
Dissertation München 1969
80. SIEGEL, L. M., K. J. MONTY:
Biochim. Biophys. Acta 112, 346 (1966)
81. SMITHIES, O.:
Biochem. J. 71, 585 (1959)

82. STERN, R., L.H.BIRD:
Biochem.J. 44, 635 (1949)
83. SVEDBERG, T., K.O.PEDERSON:
Die Ultrazentrifuge. Dresden, Leipzig (1940)
84. TISSELIUS, A.:
Nova Acta Reg.Soc.Scie.Upps (V) 7, 4 (1930)
85. TRACEY, M.V., D.J.WINZOR:
Interpretation of Zonal Asymmetry in Gel Filtration.
Arch.Biochem.Biophys. 117, 184 (1966)
86. TRAINER, T.D., D.GRUENIG:
A Rapid Method for the Analysis of CPK-Isoenzymes.
Clin.Chim.Acta 21, 151 (1968)
87. WACHSMUTH, E.D., G.PFLEIDERER:
Biochemische Untersuchungen an kristallinen
Isoenzymen der LDH aus menschlichen Organen
Biochem.Z. 336, 545 (1963)
88. WEBER, H.H., K. MEYER:
Biochem. Z. 266, 137 (1933)
89. WIEME, R.J.: Etude par Enzymoelectrophorese des Dehydro-
genase de l'Acide Lactique et du Sorbitol
Bull.Soc.Chim.Biol. 41, 235 (1959)
90. WIEME, R.J.: Application Diagnostique de l'Enzymo-Electro-
phorese des Dehydrogenase de l'Acide Lactique.
Clin.Chim.Acta 4, 46 (1959)
91. WROBLEWSKY, F.:
Diagnostic Dissection by Isoenzymes Pure appl.
Chem. 3, 385 (1961)

Herrn Prof. Dr. H. NOWY danke ich aufrichtig für die Überlassung des Themas und für die bereitwillige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch Frau KRÜLLE, die mir geholfen hat, verschiedene technische Arbeiten zu bewältigen.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. W. SEITZ für die Möglichkeit, an seiner Klinik Untersuchungen durchführen zu können.

LEBENS LAUF

Am 18. Oktober 1945 wurde ich, Gerhard Meister, als zweiter Sohn des Kriminalhauptmeisters Erwin Meister und dessen Ehefrau Charlotte, geb. Bracks, in Augsburg geboren.

In meiner Heimatstadt besuchte ich die Volksschule und anschließend das naturwissenschaftliche Holbein-Gymnasium, an dem ich im Juni 1965 die Hochschulreife erwarb.

Im Herbst desselben Jahres wurde ich zu einem achtzehnmonatigen Grundwehrdienst in einer Fernmeldeeinheit eingezogen.

Mit dem Sommersemester 1967 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig Maximilians-Universität in München, und legte dort im Oktober 1969 die ärztliche Vorprüfung ab.

Seit dem 18. April 1969 bin ich mit Krimhilde Meister, geb. Donderer, verheiratet.

Am 14. Februar legte ich die ärztliche Prüfung an der Universität München erfolgreich ab.

